

Die Fermente des Blutes
und ihre Bestimmungsmethoden

Claudia Wiedemann-Bücklers

Aus der Zweiten Medizinischen Universitätsklinik München
Direktor: Professor Dr. Dr. G. Bodechtel

DIE FERMENTE DES BLUTES

UND IHRE BESTIMMUNGSMETHODEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Claudia Wiedemann-Bücklers
aus
München-Gladbach

1959



5349/60

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent: Professor Dr. med. O. Wieland
Korreferent: Professor Dr. Dr. G. Bodechtel
Dekan: Professor Dr. med. H. Schwiegk

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Dezember 1959

Einleitung	1
1. Kapitel: Die ersten Schritte	1
2. Kapitel: Die ersten Schritte	1
3. Kapitel: Die ersten Schritte	1
4. Kapitel: Die ersten Schritte	1
5. Kapitel: Die ersten Schritte	1
6. Kapitel: Die ersten Schritte	1
7. Kapitel: Die ersten Schritte	1
8. Kapitel: Die ersten Schritte	1
9. Kapitel: Die ersten Schritte	1
10. Kapitel: Die ersten Schritte	1

Meinen Eltern

11. Kapitel: Die ersten Schritte	1
12. Kapitel: Die ersten Schritte	1
13. Kapitel: Die ersten Schritte	1
14. Kapitel: Die ersten Schritte	1
15. Kapitel: Die ersten Schritte	1
16. Kapitel: Die ersten Schritte	1
17. Kapitel: Die ersten Schritte	1
18. Kapitel: Die ersten Schritte	1
19. Kapitel: Die ersten Schritte	1
20. Kapitel: Die ersten Schritte	1
21. Kapitel: Die ersten Schritte	1
22. Kapitel: Die ersten Schritte	1
23. Kapitel: Die ersten Schritte	1
24. Kapitel: Die ersten Schritte	1
25. Kapitel: Die ersten Schritte	1
26. Kapitel: Die ersten Schritte	1
27. Kapitel: Die ersten Schritte	1
28. Kapitel: Die ersten Schritte	1
29. Kapitel: Die ersten Schritte	1
30. Kapitel: Die ersten Schritte	1



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Inhaltsübersicht

Einleitung	VII
Verzeichnis der Abkürzungen	VIII
Adenosin-Desaminase	1
Aldolase	4
Äpfelsäure-Dehydrogenase	15
Arginase	18
Carboanhydrase	23
Cholesterin veresterndes Enzym	28
Cholinesterasen	36
Coeruloplasmin	47
Desoxyribonuklease	55
Diastase (Amylase)	60
Esterasen	67
Fermente des Galaktosestoffwechsels	78
Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase	82
β -Glukuronidase	87
Glutaminsäure-Dehydrogenase	94
Glutathion-Reduktase	98
Hyaluronidase	103
Katalase	108
Lipase (siehe unter Esterasen)	67
Milchsäure-Dehydrogenase	115
5-Nukleotidase	125
Ornithin-Carbamyl-Trans ferase	130
Oxytocinase	133
Pepsinogen	135
Peptidasen	139
Phosphatasen	144
Phosphofrukt-Aldolase	160
Phosphohexo-Isomerase	163
Phosphoribo-Isomerase	167
Sorbit-Dehydrogenase	171
Thrombozytenfermente	174
Transaminasen	175
Trypsin	184

DIE FERMENTE DES BLUTES UND IHRE BESTIMMUNGSMETHODEN

EINLEITUNG

Im Laufe der letzten Jahre haben die Ergebnisse der Enzymforschung eine immer größere Bedeutung auch für die Klinik gewonnen. Aus den Veröffentlichungen der jüngsten Zeit seien nur die Arbeiten von ABDERHALDEN (1) und RICHTERICH (2) genannt.

Vor allem für die Differentialdiagnose der verschiedensten Krankheitsbilder hat sich die Bestimmung der Fermente als wertvoll erwiesen.

Sie erlaubt jedoch auch neue Einblicke in die Pathogenese mancher bisher nicht erklärbarer Stoffwechselstörungen.

Auf die steigende Bedeutung der Enzyme für die Therapie kann in diesem Rahmen nicht näher eingegangen werden.

Die vorliegende Arbeit beschränkt sich bewußt darauf, die Methoden darzustellen, welche sich für die Aktivitätsbestimmung der klinisch wichtigen Fermente - speziell des Blutes - als zuverlässig erwiesen haben. Darum wurde der klinische Teil (Physiologie und Pathologie der einzelnen Enzyme) absichtlich knapp gehalten. Ausführliche Darstellungen der Enzymopathologie finden sich bei ABDERHALDEN (1) und RICHTERICH (2).

(1) Abderhalden, R.: Klinische Enzymologie,
G. Thieme Verlag, Stuttgart (1958)

(2) Richterich, R.: Enzymopathologie,
Springer Verlag (1958)

Verzeichnis der Abkürzungen

ACh	Acetylcholinesterase
AD	Adenosin-Desaminase
ÄDH	Äpfelsäure-Dehydrogenase
ADP	Adenosin-Diphosphorsäure
ALD	Aldolase
AMP	Adenosin-Monophosphorsäure
Aph	Alkalische Phosphatase
ATP	Adenosin-Triphosphorsäure
BE	Bodansky-Einheit
BTS	Brenztraubensäure
CAH	Carboanhydrase
DPN	Diphosphopyridin-nukleotid
DPNH	reduziertes Diphosphopyridin-nukleotid
EDTA	Aethylen-diamin-tetraessigsäure
FDP	Fructose-1, 6-diphosphat
F-6-P	Fructose-6-phosphorsäure
Gal-1-P	α -Galaktose-1-phosphat
GD	Glutaminsäure-Dehydrogenase
GE	Gutman-Einheit
GOT	Glutaminsäure-Oxalessigsäure-Transaminase
GPD	Glycerophosphat-Dehydrogenase
GPT	Glutaminsäure-Brenztraubensäure-Transaminase (BTS = pyruvic acid)
GR	Glutathion-Reduktase
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	oxydiertes Glutathion
G-1-P	Glucose-1-phosphat
G-6-P	Glucose-6-phosphat
G-6-PD	Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase
Hb	Hämoglobin
KAE	King-Armstrong-Einheit
MDH	Milchsäure-Dehydrogenase
OCT	Ornithin-Carbamyl-Transferase
PFA	1-Phosphofrukt-Aldolase
PGal-Transferase	= Phospho-Galaktose-Uridyl-Transferase

PHI	Phosphohexo-Isomerase
PP	anorganisches Pyrophosphat
R-5-P	Ribose-5-phosphat
Ru-5-P	Ribulose-5-phosphat
SALD	Serum-Aldolase
SCh	Serum-Cholinesterase
SDH	Sorbit-Dehydrogenase
SGOT	Serum-Glutaminsäure-Oxalessigsäure-Transaminase
SGPT	Serum-Glutaminsäure-Brenztraubensäure-Transaminase
SMDH	Serum-Milchsäure-Dehydrogenase
SPh	Saure Phosphatase
TCE	Trichloressigsäure
TIM	Triose-Isomerase
TPN	Triphosphopyridin-nukleotid
TPNH	reduziertes Triphosphopyridin-nukleotid
UDPG	Uridin-diphospho-glucose
UDPGal	Uridin-diphospho-galaktose

ADENOSIN-DESAMINASE

Das Ferment katalysiert die Desaminierung von Adenosin und spielt so eine Rolle im Stoffwechsel der Nukleotide.



Das Enzym ist im Plasma schon normalerweise enthalten.

Über die Eigenschaften der Adenosin-Desaminase (AD) ist noch nichts Näheres bekannt.

Normalwerte:

STRAUB (4; 5) nahm eine Aktivität des Enzyms von 1,07 E als Grenzwert; LETNANSKY und SEELICH (3) setzten 0,9 E als Grenze der pathologischen Werte fest.

Im Blutplasma von Mäusen mit Ehrlich-Ascites-Carcinom ist die AD 3 - 4mal höher als bei gesunden Tieren (4; 5). Analoge Verhältnisse wurden auch bei Ratten mit Novikoff-Hepatom beobachtet (1).

Klinik

Bei Krebs, aber auch bei anderen Erkrankungen, die mit Entzündungen verbunden sind, treten erhöhte Fermentwerte im Plasma (1,23 E) auf. Eindeutig gesteigerte Aktivität fand sich bei Lungenkrebs in 92 % der Fälle; bei den übrigen untersuchten Patienten mit Neoplasmen in 78 % der Fälle (1,02 E).

62 % der Patienten mit Tbc zeigten einen vermehrten AD-Gehalt des Plasmas (1,01 E).

Abnorm hohe Werte wurden bei chronisch-myeloischer und chronisch-lymphatischer Leukämie beobachtet (1,69 E).

Beim Bronchus-Carcinom scheint eine Beziehung der Ferment-Aktivität zur Schwere und Ausdehnung der Erkrankung zu bestehen (2).

(Die angegebenen Werte sind Mittelwerte.)

Bestimmung der ADENOSIN-DESAMINASE im Serum

LETNANSKY, K. und SEELICH, F.: Klin. Wschr. 36 (1958) 826.

Prinzip

Beim Übergang von Adenosin in Inosin ändert sich die spektrale Absorption im ultravioletten Bereich bei 260 m μ , wodurch die Reaktion auf einfachem Wege optisch gemessen werden kann.

Reagentien

1. Adenosinlösung (z. B. von Merck)
2. Phosphatpuffer 0,1 m, pH 7,2 (0,2 %ig)
3. Perchlorsäure 10 %ig

Ausführung

Zur Bestimmung der Adenosin-Desaminase (AD) kann man heparinisiertes oder Citratblut verwenden. Stark trübe, hämolytische oder ikterische Seren oder Plasmen eignen sich nicht.

2 ml Plasma werden mit 1 ml einer Lösung von Adenosin in 0,1 m Phosphatpuffer von pH 7,2 (0,2 %ig) versetzt. Die Fermentaktivität des so mit Substrat angereicherten Plasmas wird spektralphotometrisch bestimmt:

Zu 1 ml des adenosinhaltigen Plasmas werden 2 ml einer 10 %igen Perchlorsäure gegeben. Das ausgefällte Eiweiß wird abzentrifugiert.

Der restliche Teil des mit Adenosinlösung vermischten Plasmas wird 60 min auf einer Temperatur von 38 Grad C gehalten, wobei durch die Aktivität der AD ein Teil des Adenosins in Inosin übergeführt wird. Nach beendigter Inkubation wird auf die gleiche Weise enteiweißt und die Fällung abzentrifugiert.

Nach dem Zentrifugieren wird je 1 ml des Überstandes mittels Aq. dest. auf das 40-fache Volumen verdünnt. Der Nullwert und der 60 min-Wert werden bei den Wellenlängen 240 und 265 m μ gegen Wasser gemessen.

Standardisierung

Aus den Meßwerten läßt sich unter Bezugnahme auf die molaren Extinktionskoeffizienten die Abnahme an Adenosin und die Zunahme an Inosin berechnen (E_{260} für Adenosin bei pH 2 : 14,3; E_{260} für Inosin bei pH 3 : 7,1).

Die Bestimmung beider Konzentrationen ermöglicht eine genauere Ermittlung der Fermentaktivität als die alleinige Messung des Adenosinverbrauches.

Obere Grenze des Normalbereichs: 0,9 E.

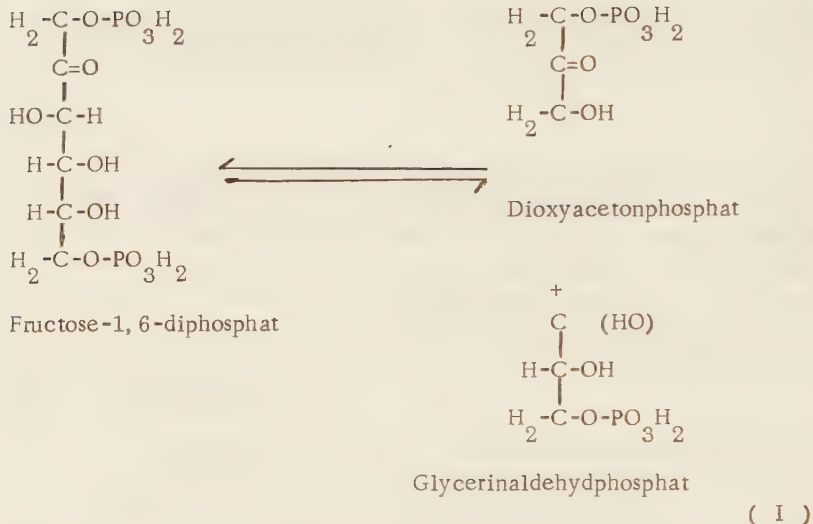
(Nur in 7 % der Fälle treten bei anscheinend Gesunden hohe, d.h. Werte über 0,9 E auf.)

Eine Einheit bezeichnet jene Aktivität, die unter den beschriebenen Versuchsbedingungen den Umsatz von 1 μ M Adenosin pro ml Serum bewirkt.

Literatur

- 1) Lamirande, G. de, und Allard, Cl. (1957): zitiert bei 3)
- 2) Letnansky, K. und Seelich, F.: Münch. Med. Wschr. 100 (1958) 1805
- 3) Letnansky, K. und Seelich, F.: Klin. Wschr. 36 (1958) 826
- 4) Straub, F.B. et al. : Biochimia 22 (1957) 118, zitiert bei 3)
- 5) Straub, F.B. et al. : Orv. Hetil. (1957) 256, zitiert bei 3)

ALDOLASE



Das Enzym spielt eine wesentliche Rolle bei der Glykolyse, indem es nach obiger Reaktion (I) zur Bildung der Triosephosphate führt.

Die Aldolase (ALD) kommt im tierischen Organismus ubiquitär vor, besonders reichlich im Muskel und in der Leber. Im Blutserum des Menschen ist relativ wenig ALD vorhanden.(1) Reich an ALD sind auch die Erythrozyten. Ihre Fermentkonzentration ist etwa 100mal größer als diejenige im Serum. (8) Deshalb ist bei Serumuntersuchungen Hämolyse unter allen Umständen zu vermeiden.

Der ALD-Gehalt des Blutes weist keinerlei Beziehungen zum Ernährungszustand auf und wird durch Stress-Wirkungen (operative Eingriffe) nicht beeinflusst. (1)

Das pH-Optimum der Serum-ALD liegt zwischen 7 und 8. In Collidinpuffer wird die größte Aktivität erreicht. Etwas geringer ist die Aktivität in Veronalpuffer. Phosphat- und Boratpuffer hemmen. Die ALD des Serums hat ihr Temperatur-Optimum bei 46 Grad C. (1)

Klinik

Besondere Bedeutung hat die Bestimmung der ALD für die Differentialdiagnose

der Progressiven Muskeldystrophie (ERB). Bei dieser Krankheit finden sich hohe Fermentwerte im Serum (2; 13; 17; 20); im Muskel ist die Aktivität der ALD hingegen vermindert (1). Der Grad des Anstiegs geht der Schwere der Progredienz parallel (16). Eine Beziehung zwischen der Höhe des Enzymspiegels und der Schwere der Krankheit wird allerdings von ABDERHALDEN bestritten (1). Nach anderen Beobachtungen fallen die ALD-Werte parallel mit der klinischen Besserung ab. Es wird daher die Bestimmung der Serum-ALD zur Kontrolle therapeutischer Versuche empfohlen (4).

Die höchsten Aldolasewerte im Blut werden bei kindlichen Patienten mit progressiver Muskeldystrophie angetroffen. Mit dem Fortschreiten der Erkrankung nimmt die Hyperaldolasämie kontinuierlich ab (2; 20).

Aus verschiedenen Untersuchungen geht hervor, daß bei Morbus Erb eine schwere Störung der Glykolyse im Muskel vorliegt. Die Frage, ob sie die Ursache der Krankheit oder nur die Folge einer anderen primären Störung des Muskelstoffwechsels ist, kann zur Zeit nicht beantwortet werden (1).

Bei sekundären Muskelatrophien infolge von Hunger, Paralyse cerebralen Ursprungs, Poliomyelitis, infantiler spinaler Muskelatrophie oder Muskelatrophien nervösen Ursprungs ist die ALD im Serum nicht erhöht (2; 10).

Auch für die Differentialdiagnose von Leberkrankheiten ist die Bestimmung der Serum-ALD von Wert.

Bei der akuten Hepatitis zeigt sich ein starker Übertritt von ALD ins Serum (6; 9; 12; 13). Gleichzeitig sinkt die Aktivität des Enzyms in der Leber ab.

Andere Leberkrankheiten wie chronische Hepatitis, Verschlußikterus und Leberzirrhose weisen höchstens eine leichte Vermehrung des Serumgehaltes an ALD auf (6; 9; 12; 13).

Erhöhte ALD-Werte im Serum während tuberkulostatischer Behandlung sind ein Zeichen für toxische Leberschädigung. Erst nach Absetzen des betreffenden Medikamentes kehrt die ALD wieder zur Norm zurück (11).

Auch der Myokardinfarkt ist von erhöhten ALD-Werten begleitet (7; 15). Die ALD zeigt hierbei einen den Transaminasen ähnlichen Verlauf (s. d. S. 176 ff.). Der Anstieg erreicht das Maximum etwa am 3. Tag und sinkt bis zum 20. Tag wieder auf die Norm ab (7).

Bei unbehandelten fortgeschrittenen Prostata-Carcinomen steigt der ALD-Gehalt im Serum. Hormontherapie führt zum Absinken des Fermentspiegels auf die Norm. Wenn die Kranken nicht auf die Therapie ansprachen, blieb die

Normalisierung aus. Testosteron bewirkte eine Steigerung der ALD-Menge (3).

Da sich bei der Prostata-Hypertrophie normale ALD-Werte finden, kommt der Bestimmung des Enzyms eine differentialdiagnostische Bedeutung zu (1).

Erhöhte ALD-Werte wurden auch bei Nephrose (12), schwerer hämolytischer Anämie (6), Operation (7), hochfieberhaften Infektionen (7) und akuter Magen-Darm-Infektion durch Staphylococcus aureus bei einer Lebensmittelvergiftung (18) beobachtet, ebenso bei hämorrhagischer Pankreatitis (6).

Bei Myelosen ist der ALD-Gehalt im Serum und in den weißen Blutzellen (19) erhöht. Perniciöse Anämie ist von einer gesteigerten Fermentaktivität sowohl im Serum als auch in den Erythrozyten begleitet (5). Die ALD-Werte sind bei diesen Blutkrankheiten durchweg weniger hoch, als die entsprechende MDH-Aktivität.

Der Fermentgehalt der Erythrozyten ist außerdem vermehrt bei Leberzirrhose und Coma hepaticum (5).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß dem ALD-Test eine große Bedeutung für die Differentialdiagnose der Lebererkrankungen zukommt. Er ist dem Phosphatsetest, der Takatareaktion, dem Thymoltrübungstest und der Eisenbestimmung deutlich überlegen und erlaubt insbesondere eine Frühdiagnose der Hepatitis (1). Eine Zunahme des ALD-Gehaltes im Blut bei Muskelerkrankungen wird nur bei der Progressiven Muskeldystrophie (ERB) angetroffen und ist daher für diese Krankheit pathognomonisch (1).

A. Bestimmung der Aldolase im Serum (Enzymatischer Test)

Biochemica "BOEHRINGER", C. F. Boehringer und Söhne, GmbH, Mannheim.

Prinzip

Das nach der Reaktionsgleichung (I) gebildete Dioxyacetonphosphat wird mit dem Hilfsenzym Glycerophosphat-Dehydrogenase (GPD) nach folgender Gleichung weiter umgesetzt:



Dioxyacetonphosphat

α -Glycerophosphat

Dabei kann das im Zuge der Reaktion verschwindende DPNH in bekannter Weise optisch bei 340 μ gemessen werden. Für den optimalen Ablauf des Testes muß als zusätzliches Hilfsenzym Triose-Isomerase (TIM) vorhanden sein, wodurch die vollständige Umwandlung von Hexosediphosphat in Dioxyacetonphosphat gewährleistet ist.

(Ein Mischpräparat aus GPD - TIM ist im Handel erhältlich, z.B. bei Boehringer und Söhne GmbH, Mannheim).

Reagentien

1. 2, 4, 6-Trimethylpyridin (Collidin)
2. Monojodessigsäure, Natriumsalz
(Die Substanzen 1. und 2. sind als gebrauchsfertiger Collidinpuffer "E" lieferbar (CLP-F 15045) durch die Fa. Boehringer und Söhne GmbH, Mannheim).
3. Fructose-1, 6-diphosphorsäure, Natriumsalz
4. Reduziertes Diphosphopyridinnukleotid, DPNH
5. Glycerophosphat-Dehydrogenase / Triosephosphat-Isomerase GPD / TIM

(Sämtliche Reagentien sind bei der Fa. Boehringer und Söhne GmbH, Mannheim erhältlich.)

Herstellung der Lösungen:

- I. Collidinpuffer "E" (Konzentrat) / Fructose-1, 6-diphosphat 0,056 m, pH 7,4; $3 \cdot 10^{-4}$ m an Monojodacetat;
 $2 \cdot 10^{-3}$ m an Fructose-1, 6-diphosphat.
Die in Fläschchen (1) befindliche Lösung wird mit Aqua bidest. auf 100 ml verdünnt.

II. DPN-H.

$1,5 \cdot 10^{-2}$ m DPN-H

Die in Fläschchen (2) befindliche Substanz wird mit 2 ml Aqua bidest. in dem Fläschchen gelöst.

III. GPD / TIM

2 mg Enzymprotein im ml.

Die in Fläschchen (3) befindliche Kristallsuspension wird unverdünnt verwendet.

Ausführung

Man verwendet nur frisches hämolysefreies Serum. Ein gesonderter Leeransatz ist nicht erforderlich. (Während der ersten 15 min Inkubationszeit reagieren Spuren von Dioxyacetonphosphat aus dem Fructose-1, 6-diphosphat-Präparat ab. Geringste Verunreinigungen der GPD/TIM durch Aldolase machen einen Fehler von weniger als 2 % aus. Will man diesen exakt ermitteln, mißt man einen Ansatz mit Wasser statt Serum.) Es ist jedoch zweckmäßig, gegen eine Küvette mit 2, 8 ml H_2O + 0, 2 ml Serum zu messen, um die oft erhebliche Färbung des Serums zu kompensieren.

Man pipettiert nacheinander in das Teströhrchen:

2, 74 ml Lösung I

0, 05 ml Lösung II

ca. 0, 01 ml Lösung III

Dann wird durch Umschwenken gemischt und das Röhrchen etwa 5 min bei 37 Grad C im Wasserbad gehalten. (Steht ein temperierbarer Küvettenhalter zur Verfügung, so mißt man die gesamte Reaktion direkt in der Küvette.) Nun gibt man 0, 20 ml Serum zu. Die Reaktion läuft jetzt.

Das Reaktionsgemisch wird in eine 10 mm-Küvette gegossen. Etwa 2 - 3 min nach Zugabe des Serums liest man die Extinktion bei 340 oder 366 $m\mu$ gegen Wasser + Serum (s. o.) ab (E_1), - (verwendet man Küvetten mit einer Schichtdicke von 5 mm, so ist bei der Berechnung der Versuchsergebnisse das nach der angegebenen Formel erhaltene Resultat noch mit 2 zu multiplizieren), - und drückt gleichzeitig auf die Stoppuhr. Der Küvetteninhalt wird in das Teströhrchen zurückgegossen und weiter bei 37 Grad C 20 min lang (beides genau!) inkubiert. Danach wird erneut gemessen wie oben (E_2).

$E_1 - E_2 = \Delta E$ ist die in der Inkubationszeit von 20 min erfolgte Extinktionsänderung. Bei sehr großen Aldolase-Aktivitäten (ΔE über 0, 250) muß man das Serum 1 : 1 mit H_2O verdünnen.

Standardisierung

Eine Aldolase-Einheit nach BRUNS ist gegeben, wenn 1 ml Serum pro Std bei 37 Grad C 1 μ l Fructose-1, 6-diphosphat (FDP) spaltet. 1 μ l FDP = 0,0446 μ Mol FDP.

Eine Extinktionsdifferenz $\Delta E = 0,100$ entspricht bei 366 m μ einem DPNH-Umsatz von 0,030 μ Mol/ml oder $1/2 \cdot 0,030 \cdot 3 = 0,0454$ μ Mol FDP in 3,0 ml.

Somit sind für 1 ml Serum ein ΔE_{366} von 0,100 pro Std im enzymatischen Test = 1,02 Aldolase-Einheiten nach BRUNS.

Für die bei 340 m μ erfolgte Messung ist zur Berechnung der Einheiten gemäß dem Verhältnis der Extinktionskoeffizienten von DPN-H für 366 bzw. 340 m μ durch 1,89 zu dividieren.

Somit sind für 1 ml Serum ein ΔE_{340} von 0,100 pro Std im enzymatischen Test = 0,54 Aldolase-Einheiten nach BRUNS.

Es ist also bei Verwendung von 0,2 ml Serum und 20 min (= 1/3 Std) Inkubationszeit

$$\frac{\Delta E_{366} \cdot 10,2}{1/3 \cdot 0,2} = \Delta E_{366} \cdot 153 = \text{Aldolase-Einheiten nach BRUNS.}$$

Für die Messung bei 340 m μ gilt also: $\Delta E \cdot 81 = \text{Aldolase-Einheiten nach BRUNS}$, bei 366 m μ : $\Delta E \cdot 153 = \text{Aldolase-Einheiten nach BRUNS}$.

Die Normalwerte liegen zwischen 3 und 8 E. Aldolase-Einheiten über 20 sprechen für die Diagnose einer akuten Hepatitis.

B. Bestimmung der ALDOLASE im Serum (Colorimetrischer Test)

Methode von SIBLEY und LEHNINGER (30), modifiziert von BRUNS (26).

Prinzip

Das Verfahren von SIBLEY und LEHNINGER (30) beruht auf der Reaktion von d-Glycerinaldehydphosphat und Dioxyacetonphosphat mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin. Das Kondensationsprodukt der Triosen mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin gibt in Alkali eine rote Farbe mit einem Absorptionsmaximum bei 535 - 540 m μ .

Reagentien

1. Fructose-1, 6-diphosphat in einer Konzentration von 0,06 M, pH 7,4 (im Handel erhältlich) (25).

Das Natriumsalz wird aus dem gereinigten Calciumsalz mit Na_2CO_3 dargestellt. Bei der Fällung des Calciums entstehen in jedem Falle Verluste an Fructose-1, 6-diphosphorsäure (FDP). Es ist deshalb notwendig, die Lösung vor Gebrauch durch Bestimmung der Fructose nach ROE (29) oder des FDP-Phosphors nach FISKE und SUBBAROW (27) einzustellen. (In 1-n H_2SO_4 werden in 10 min 37 %, in 1 Std 67 % des FDP-Phosphors abgespalten.) Die Endkonzentration der FDP im Enzymsatz ist 0,005 m.

Die gebrauchsfertige Lösung wird im Eisschrank (nach Zugabe einiger Tropfen Toluol) oder besser in gefrorenem Zustand aufbewahrt. Sie hält sich 2 - 3 Wochen (25).

2. 0,56 m Hydrazin.

Hydrazinsulfat wird mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt.

3. 0,002 m Jodacetat, pH 7,4.

4. 0,1 m Collidinpuffer (eingestellt mit HCl auf pH 7,4)
(2,4,6-Trimethylpyridin).

Die Lösungen 2 - 4 können zusammen in einer Vorratsflasche aufbewahrt werden. Die Mischung erfolgt im Verhältnis: 100 Teile Collidinpuffer + 25 Teile Hydrazin + 25 Teile Jodacetat + 25 Teile Aqua dest.

5. 2,4-Dinitrophenylhydrazin (250 mg in 250 ml 2-n HCl).

6. Trichloressigsäure, 10 %ig.

7. 0,75-n NaOH.

Die pH-Werte werden mit der Glaselektrode eingestellt und kontrolliert. Die Bestimmung wird bei einer Temperatur von 38 Grad C durchgeführt.

Ausführung

1,0 ml Serum wird mit 1,0 ml Collidinpuffer, 0,25 ml Hydrazin, 0,25 ml Jodacetat, 0,25 ml Aqua dest. (oder 1,75 ml "Gemisch" der Lösungen 2 - 4) und 0,25 ml FDP-Lösung versetzt. (Gesamtvolumen = 3,0 ml.)

Man inkubiert 1 Std bei 37 Grad, enteiweißt mit 3,0 ml Trichloressigsäure und filtriert. Zu 1,0 ml Filtrat gibt man 1,0 ml 0,75 n NaOH und läßt 10 min bei Zimmertemperatur stehen. Das Alkalisieren bezweckt die Abspaltung des

alkalihydrolysierbaren P der Triosephosphate, da die freien Triosen eine wesentlich beständigere Farbreaktion geben, als die Ester (30). Nach Zugabe von 1,0 ml 2,4-Dinitrophenylhydrazin erwärmt man 10 min im Wasserbad auf 38 Grad C. Nun wird mit NaOH auf 10,0 ml aufgefüllt. Es entwickelt sich eine rote Farbe mit einem Absorptionsmaximum bei $540\text{ m}\mu$. Die Farbintensität wird daher in diesem Bereich photometrisch gemessen (Schichtdicke 10 mm).

Die Messung erfolgt gegen einen Leerwert, der sich dadurch vom Fermentansatz unterscheidet, daß FDP nach dem Enteiweißen zugesetzt wird. Die Messung wird zwischen der 3. und der 15. Minute nach der Farbentwicklung durchgeführt, danach nimmt die Extinktion langsam ab. Nach insgesamt 20 min beträgt die Abnahme 2 - 4 %, nach 30 min 6 - 8 %, nach 1 Std. 10 - 15 % und nach 2 Std. 35 - 50 %.

Glycerinaldehyd und Dioxyaceton geben eine verschieden starke Farbreaktion (30). Durch Hydrazin wird ein Abfangen der Triosen im Verhältnis 1 : 1 garantiert. Hierdurch bleibt die Beziehung zwischen der Konzentration der Triosen und der Farbintensität linear, die Einstellung eines neuen Gleichgewichtes durch die Triosephosphat-Isomerase des Serums (31) wird verhindert.

Standardisierung

1 Aldolase-Einheit nach BRUNS liegt vor, wenn 1 ml Serum pro Std. bei 37 Grad C 1 μ l FDP spaltet.
(1 Mikroliter FDP = 0,0446 Mikromol FDP).

Die Anlegung einer Eichkurve kann bei BRUNS (S. 158 der oben genannten Arbeit) nachgelesen werden.

Eichkurven

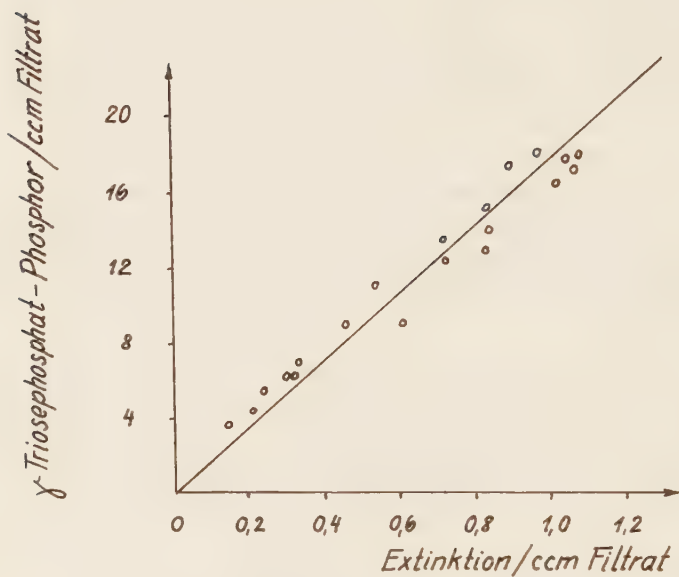


Abb. 1

Lineare Beziehung zwischen dem Triose-P-Gehalt/ccm in Trichloressigsäure-filtrat und dem roten Triosefarbstoff. Die Eichgrade wurden unter Benützung verschiedener Enzymquellen (Serum, Hämolysate, wässrige Extrakte aus Leber und Niere) angelegt.

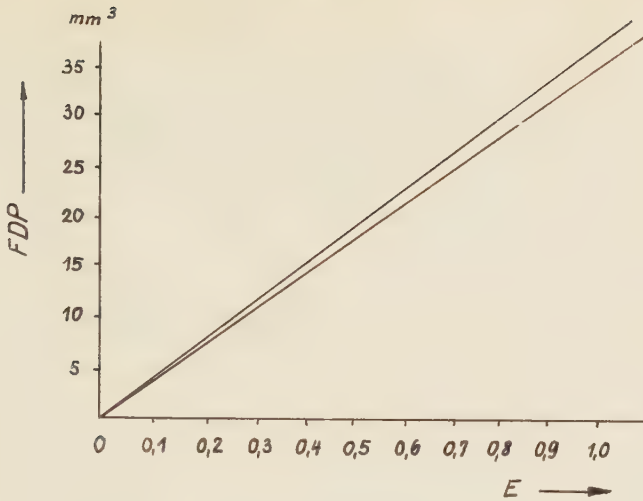


Abb. 2

Eichgrade für die Umrechnung des Extinktionswertes in " mm^3 FDP gespalten". Die Gerade wurde aus den Daten, die auch Abb. 1 zugrunde liegen, konstruiert. Sie wurde so angelegt, daß die Spaltungswerte für 1,0 ccm Serum direkt abgelesen werden können.

Obere Gerade: Beckman Spectrophotometer (Modell DU), 540 m μ ;
10 mm Schichtdicke; Spaltbreite 0,08 mm.

Untere Gerade: Pulfrich - Photometer, Filter S 53, 10 mm Schichtdicke.

Literatur

- 1) Abderhalden, R. : Klinische Enzymologie p. 93 ff., G. Thieme Verlag (1958)
- 2) Aronson, S. M. und Volk, B. W. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 94 (1957) 360
- 3) Baker, R. und Govan, D. : zitiert bei 1)
- 4) Beckmann, R. : Klin. Wschr. (1956) 1237
- 5) Bock, H. E. et al. : Klin. Wschr. (1958) 56
- 6) Brown, R. K. : Klin. Wschr. (1958) 1
- 7) Hauss, W. H. und Leppelmann, H. J. : Klin. Wschr. (1957) 65
- 8) Hennemann, H. H. und Klaus, D. : Klin. Wschr. (1958) 516
- 9) Hinsberg, K. und Bruns, F. : Dtsch. Med. Wschr. (1957) 48
- 10) Jacob, W. und Neuhaus, J. : Klin. Wschr. (1954) 923
- 11) Kikuchi, H. : Medizinische (1957) 187
- 12) Maier, E. H. : Dtsch. Med. Wschr. (1956) 1677

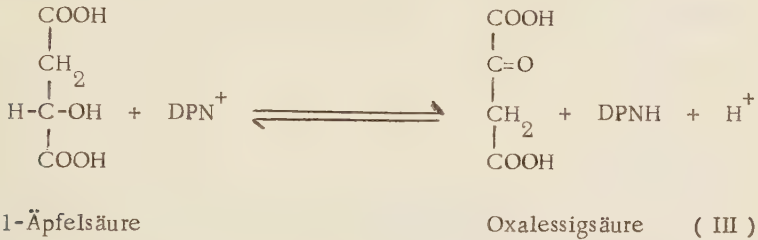
- 13) Reinhold, J.G.: Ann. Rev. Med. (1956) 170
- 14) Remy, D. und Wieding, J.: Ärtzl. Forschg. 11 (1957) I/502
- 15) Siegel, A. und Bing, R.J.: Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 91 (1956) 604
- 16) Shapira, G. et al.(1953): zitiert bei 4)
- 17) Shapira, G. et al.(1955): zitiert bei 20)
- 18) Studnitz, W.v.(1956): zitiert bei 7)
- 19) Valentine, W.N.(1955): zitiert bei 14)
- 20) White, A.A. und Hess, W.C.: Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 94 (1957) 541

Bestimmung

- 25) Fa. C.F. Boehringer GmbH, Mannheim-Waldhof.
- 26) Bruns, F.: Biochem.Z. 325 (1954) 156
- 27) Fiske, C.H. und Subbarow, Y.: J.Biol.Chem. 66 (1925) 375
- 28) Neuberg, C. et al.: Arch.Biochem. Biophys. 3 (1943/44) 33
- 29) Roe, J.H.: J.Biol.Chem. 107 (1934) 15
- 30) Sibley, J.A. und Lehninger, A.L.: J.Biol.Chem. 177 (1949) 859
- 31) Warburg, O. und Christian, W.: Biochem.Z. 314 (1943) 149

ÄPFELSÄURE-DEHYDROGENASE

Das für l-Äpfelsäure streng spezifische Ferment (4) katalysiert die reversible Reaktion:



Die Äpfelsäure-Dehydrogenase (ÄDH) ist damit maßgeblich am Endabbau der in den Citronensäure-Cyclus eingegangenen Substanzen beteiligt.

Normales Serum enthält das Enzym in der β -Globulinfraktion (3), jedoch nur in sehr geringen Mengen (1). Außerdem kommt die ÄDH auch in allen Zellen vor, besonders in den Mitochondrien (5).

Das pH-Optimum des Fermentes liegt bei 7, 2.
Oxalessigsäure übt eine stark hemmende Wirkung aus (1).

Klinik

Der Enzymspiegel ist bei vielen Krankheiten im Serum erhöht (4), so auch bei der Leukämie (3). Die differentialdiagnostische Bedeutung der ÄDH ist deshalb nicht groß.

Beim Myokardinfarkt wurden stark erhöhte Werte gefunden, die ihr Maximum meist nach 24 Std. erreichten. Die Aktivität der ÄDH blieb dabei länger gesteigert als die der gleichzeitig bestimmten Glutaminsäure-Oxalessigsäure-Transaminase und der Phosphohexo-Isomerase (2).

Auch bei Leberkrankheiten ist der Gehalt des Serums an ÄDH vermehrt, am stärksten bei der Hepatitis epidemica (2; 4). Leberzirrhosen zeigen eine mäßige, Verschlauikterus infolge Karzinom nur geringe Erhöhung der Fermentkonzentration im Serum (2).

Bei chronischer Hepatitis zeigten sich ebenfalls gesteigerte Werte.

Erhöhte Fermentkonzentration fand man außerdem bei Thyreotoxikose, wobei sich eine deutliche Beziehung zwischen der Enzymmenge und der Höhe des

Grundumsatzes ergab (1). Die höchsten Werte im Serum wurden bei Barbiturat- und CO-Vergiftung gesehen (1).

Bestimmung der ÄPFELSÄURE-DEHYDROGENASE im Serum

SIEGEL, A. und BING, R.J.: Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med. 91 (1956) 604

Prinzip

Das Gleichgewicht der Reaktion gemäß Gleichung (III) liegt praktisch vollständig auf der Seite der Bildung von Malat. Die damit verknüpfte Dehydrierung von DPNH kann nach der optischen Methode von WARBURG spektrophotometrisch verfolgt werden, nachdem die charakteristische Absorptionsbande des DPNH bei $334\text{ m}\mu$ im Zuge der Reaktion verschwindet.

Reagentien

1. Phosphatpuffer 0,1 m, pH 7,55.
2. DPN- H_2 (Fa. Boehringer, Tutzing).
3. 0,5 m Oxalessigsäure (Fa. Boehringer, Tutzing).

Ausführung

Da die Reaktion stark die Umwandlung von Oxalacetat in Malat begünstigt und nur wenige Komponenten einbezieht, wird der Test wie folgt ausgeführt:

In eine Küvette mit der Schichtdicke $d = 1\text{ cm}$ gibt man zu 0,1 - 0,05 ml Plasma 2 ml 0,1 m Phosphatpuffer pH 7,55 und 0,1 ml DPN- H_2 (2,5 mg/ml). Das Volumen wird mit Aqua dest. auf 3,0 ml gebracht. Nach 10 - 15 min gibt man 0,1 ml einer 0,5 m Oxalessigsäure bei pH 7,0 in 0,1 m Phosphatpuffer hinzu.

Die Änderung der optischen Dichte bei der Wellenlänge $\lambda = 340\text{ m}\mu$ des DPN H_2 beobachtet man während 3 bis 4 min in Abständen von 30 sec, um die Reaktionsgeschwindigkeit zu ermitteln.

Die Oxalessigsäurelösung wird kurz vor Gebrauch zubereitet und in einem Testglas mit Glasstöpsel in Eiswasser gehalten.

Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, ist es zweckmäßig, bei konstanter Temperatur (25 Grad C) zu arbeiten (heizbare Küvettenhalter).

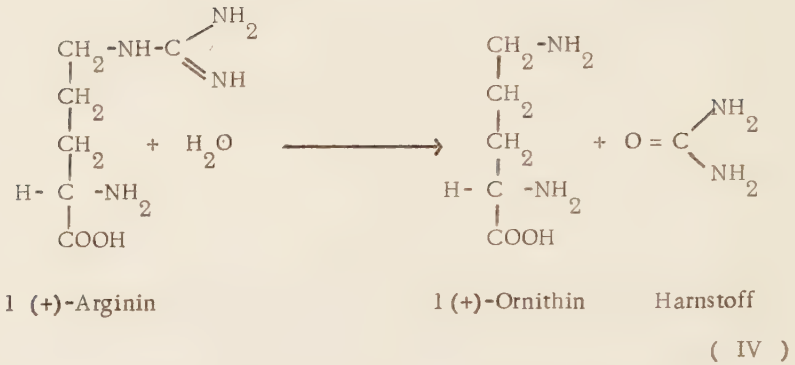
Standardisierung

Angaben über die Standardisierung der Ergebnisse waren bei den Autoren nicht zu finden. Wahrscheinlich ist 1 Einheit = Δ E 0,001 bei 340 m μ pro min.

Literatur

- 1) Abderhalden, R. : Klinische Enzymologie, p. 118 ff., G. Thieme Verlag (1958)
- 2) Bing, R.J. et al. : J. Amer. Med. Ass. 164 (1957) 647
- 3) Engelhardt-Gölkel, A. et al. : Klin. Wschr. (1958) 462
- 4) Hess, B. und Raftopoulos, R. : Dtsch. Arch. klin. Med. 204 (1957) 97
- 5) Kennedy, E.P. und Lehninger, A.L. (1949) : zitiert bei 4)

ARGINASE



Indem das Ferment die hydrolytische Umwandlung von Arginin in Ornithin katalysiert, ist es für die Harnstoffbildung in der Leber von Bedeutung.

Die physiologische Funktion der Arginase in anderen Geweben, in denen sie nachgewiesen wurde, so in Niere und Hoden, ist noch unbekannt (5).

Die Arginase kommt vor allem in der Leber vor, jedoch auch in Niere und Hoden (s. o.). Bei den weißen Blutzellen ist das Ferment nur in den Granulozyten enthalten (3). Das Blutserum zeigt normalerweise keine Arginase-Aktivität. Im Tierversuch wurde das Ferment außerdem in Lymphdrüsen und Darmschleimhaut nachgewiesen (5).

Das pH-Optimum des Enzyms liegt bei 9,8. In Lösungen zwischen pH 6,0 und etwa 10,0 wird das Ferment äußerst instabil. Diese Unstabilität in alkalischer Lösung kompliziert die Bestimmung der Eigenschaften der Arginase (5). In neutraler Lösung im Kühlschrank und sogar bei Zimmertemperatur ist das Enzym recht stabil. Trockene lyophilisierte Präparate halten sich unbegrenzt lange (5). Die Arginase ist ziemlich resistent gegen Hitze, besonders in Anwesenheit von Mn^{++} -Ionen. Gegenüber Metall-Ionen ist das Ferment stabil; nur Ag- und Hg-Ionen üben eine starke Hemmwirkung aus. Weitere Inhibitoren der Arginase sind: Ornithin (6), Cyanid (7), Chinon (7), Jod (5), Fe^{+++} -Ion (5), Citrat- und Borat-Puffer (7), sowie die Aminosäuren Glycin, Alanin und Lysin (4).

Substitution der Guanidino-Gruppe blockiert die Aktion der Arginase vollständig (5).

Aktivierend wirken Co^{++} , Mn^{++} , Ni^{++} und Fe^{++} (5).

Der Arginase-Gehalt der Organe ausgewachsener männlicher Säugetiere übertrifft bei weitem denjenigen der weiblichen Tiere. Dieser Befund sowie das Vorkommen des Enzyms im Hoden und der hohe Arginasegehalt des Spermieeiweisses deuten darauf hin, daß der Arginin-Stoffwechsel in einer festen Beziehung zur Sexualität steht (2).

Bei länger dauerndem Hunger nimmt der Gehalt der Leber an Arginase beim männlichen Tier pro Einheit Körpergewicht ab. Ein Tier kurz vor dem Hungertode zeigt einen Anstieg der Konzentration der Leber-Arginase bei beiden Geschlechtern in gleicher Weise (5).

Hypophysektomie führt im Tierversuch zu einer deutlichen Abnahme des Enzyms in der Leber, eine noch stärkere Verminderung der Fermentaktivität tritt nach Adrenalektomie ein. Die Ausfallserscheinungen werden durch Gaben von ACTH bzw. Nebennierenrinden-Hormonen wieder aufgehoben (5). Männliche und weibliche Sexualhormone übten keinen signifikanten Einfluß auf die Leber-Arginase aus (5). Eine hemmende Wirkung der Arginase auf das Wachstum maligner Tumoren wird für möglich gehalten (1).

Klinik

Bei Leberkrankheiten fand man einen erhöhten Arginasespiegel im Serum.

Unterernährung ging mit erniedrigten Werten einher.

Bei myeloischer Leukämie ist die Arginase-Aktivität in den Granulozyten des peripheren Blutes beträchtlich vermehrt. Hingegen war bei lymphatischer Leukämie in den Leukozyten praktisch keine Arginase nachweisbar (3).

Bestimmung der ARGINASE im Serum

MANNING, R. T. und GRISOLIA, S. : Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. 95
(1957) 225

Prinzip

Die Methode beruht auf der Bestimmung des gemäß Gleichung (IV) durch das Enzym aus Arginin abgespaltenen Harnstoffs. Um den Serum-Harnstoff zu eliminieren, wird das Protein zuerst mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ausgefällt, gewaschen und anschließend wieder in Lösung gebracht.

Reagentien

1. Ammonsulfatlösung, gesättigt (pH 9).
2. Physiologische Kochsalzlösung.
3. Maleat-Puffer, 0,2 m, pH 7,0, enthält 0,05 M MnCl_2 (14).
4. l-Arginin, 1,14 m, eingestellt auf pH 9,4.
5. HClO_4 , 1 m.
6. H_2SO_4 - H_3PO_4 , im Verhältnis 3 : 1 gemischt.
Man verwendet zweckmäßig technische H_2SO_4 , vermutlich, um die erforderlichen Spuren von Metallen einzubringen (15; 18).
7. Isonitroso-propriophenon, 4 % in Aethanol.

Ausführung

Das Blut wird ohne Oxalatzusatz aufgefangen, das Serum wird abgetrennt und bis zum Versuch gefroren. 2 ml Serum werden mit dem doppelten Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung gemischt und bei $4000 \times g$ 15 min lang bei 0 Grad C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Man nimmt den Protein-Niederschlag in physiologische Kochsalzlösung auf und wiederholt die Ammonsulfat-Fällung wie oben. Durch dieses Vorgehen entfernt man die Hauptmenge des im Serum vorhandenen Harnstoffes.

Routinemäßige Bestimmung der Arginase-Aktivität:

Man inkubiert die zweimal mit Ammonsulfat gefällten Proteine des Serums (gewöhnlich 1 ml Serum entsprechend) mit 0,5 ml Maleat-Puffer und 0,5 ml l-Arginin 30 min lang in Zentrifugengläsern bei 38 Grad C (Endvolumen 2 ml). Der pH der Reaktionsmischung beträgt 9,0.

Ein Leerwert ohne Serum ist inbegriffen, ebenso Leerwerte ohne Arginin für die Bestimmung des noch vorhandenen Harnstoffes. Die Aktivität ist proportional der Enzymkonzentration, vorausgesetzt, daß nicht mehr als 1 % des Substrats verbraucht wurde (14).

Die Testmischung wird durch Zugabe von 2 ml HClO_4 enteiweißt. Man zentrifugiert die Gläser 10 min lang bei $2000 \times g$ und analysiert entsprechende Mengen der proteinfreien überstehenden Flüssigkeit auf Harnstoff nach der Methode von ARCHIBALD (10) mit folgenden Modifikationen:

Proben, die nicht mehr als 1 μMol Harnstoff (gewöhnlich 2 ml) enthalten, füllt man auf 5 ml auf. 2 ml der H_2SO_4 - H_3PO_4 -Mischung und 0,4 ml Isonitroso-propriophenon werden zugesetzt. Der Inhalt der Gläser wird durchgemischt, und diese selbst werden mit Gummistöpseln, die mit Kapillar-Steig-

rohren versehen sind, verschlossen. Man erhitzt die Proben 1 Std. lang in einem zugedeckten kochenden Wasserbad. Nach Abkühlen im Dunkeln (die Farbe ist lichtempfindlich und sollte vor direktem Sonnenlicht geschützt werden) liest man die Extinktion bei 540 $m\mu$ ab.

Zur Standardisierung wird eine Eichkurve mit einer eingestellten Harnstoff-Stammlösung hergestellt.

Normalwerte bei gesunden Erwachsenen (Mittelwerte): $0,06 \pm 0,09 \mu\text{Mol}$
gebildeter Harnstoff / ml Serum (Schwankungsbreite: $.00$ bis $0,36 \mu\text{Mol}$).

Bestimmung der ARGINASE in Leukozyten

BORGHETTI, A. und SCARPIONI, L. : Enzymologia 17 (1956) 338

Prinzip

s. Bestimmung der Arginase im Serum.

Reagentien

1. Polyvinylpyrrolidon-Lösung, 4 %ig.
2. NaCl-Lösung, 0,3 %ig.
3. Isotonische Kochsalzlösung.

Ausführung

Man trennt die Erythrozyten von den Leukozyten ab durch Beschleunigung der Sedimentationsgeschwindigkeit der Erythrozyten, durch Zugabe von Fibrinogen zum Blut (12; 17) oder von Polyvinylpyrrolidon (13; 16; 19) in angemessener Konzentration. Die Trennung der Leukozyten von den Thrombozyten erfolgt durch Zentrifugieren der gewonnenen Suspension bei niedriger Geschwindigkeit. Dann werden die Leukozyten in physiologischer Lösung resuspendiert. An dieser Suspension führt man die Bestimmung durch.

Das Blut wird in einer Spritze entnommen, die Heparin enthält. 20 ml Blut versetzt man mit 5 ml 4 % Polyvinylpyrrolidon-Lösung. Man läßt die Flüssigkeit sich etwa 40 min lang absetzen, nimmt den Überstand (über den Erythrozyten) ab und zentrifugiert bei 500 U/min. Nach dem Abgießen des Überstandes, in dem die Thrombozyten enthalten sind, wird der Niederschlag in 0,3 % NaCl-Lösung resuspendiert. (Dabei werden die evtl. zurückgebliebenen roten

Blutkörperchen hämolysiert.) Man zentrifugiert, gießt von neuem ab und füllt mit isotonischer Kochsalzlösung auf. An dieser letzten Suspension wird die Berechnung der Leukozyten durchgeführt. (Am Ende dieser Arbeitsgänge besitzen die Zellen noch die Fähigkeit zur Vitalfärbung.)

Um die optimale Leukozyten-Konzentration zu bestimmen, macht man von der erhaltenen Suspension lineare Verdünnungsreihen. Dabei muß man die Substratkonzentration im Fermentsystem (Arginin 0,285 m) und die Geschwindigkeit der Hydrolyse (20 min) konstant halten.

Die optimale Verdünnung ist diejenige, welche etwa 4000 Zellen pro mm³ enthält. Der entstandene Harnstoff wird mit einer essigsauren Lösung unter Zugabe von Xanthidrol in Form von Di-Xanthidryl-Harnstoff gefällt. Man oxydiert den Di-Xanthidryl-Harnstoff mit Kaliumbichromat und bestimmt das restliche Bichromat auf iodometrischem Wege. Die Arginase-Aktivität wird ausgedrückt in mg Harnstoff, entwickelt von 10⁻¹⁰ Leukozyten.

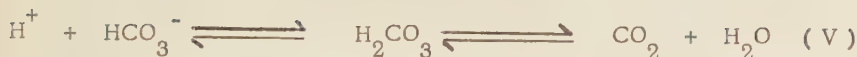
Literatur

- 1) Bach, S.J. und Lasnitzki, I.: zitiert bei 5)
- 2) Baldwin, E.: zitiert bei 5)
- 3) Borghetti, A. und Scarpioni, L.: Enzymologia (Den Haag) 17 (1956) 338
- 4) Edlbacher, S. und Zeller, A.: zitiert bei 5)
- 5) Greenberg, D.M.: in Sumner und Myrbäck: The Enzymes, Vol. I, Teil 2, p. 893
- 6) Gross, E.: zitiert bei 5)
- 7) Mohamed, M.S. und Greenberg, D.M.: zitiert bei 5)

Bestimmung

- 10) Archibald, R.M.: J. Biol.Chem. 157 (1945) 507
- 11) Borghetti, A. und Scarpioni, L.: Rass. fisiopat.Clin.Ter. 26 (1954) 648
- 12) Buckley, E.S. et al.: J.Lab.Clin.Med. 36 (1950) 28
- 13) Gleiss, J.: Klin. Wschr. 27 (1949) 177
- 14) Greenberg, D.M.: in Methods in Enzymology, Academic Press, edited by Colowick and Kaplan, Vol.II (1955) p. 368
- 15) Grisolia, S.: in Methods in Enzymology, Vol.II (1955) 351
- 16) Guillot, M. und Fiehrer, A.: Sang 19 (1948) 59
- 17) Minor, A.H. und Burnett, L.: Blood 3 (1948) 798
- 18) Ratner, S.: in Methods in Enzymology, Vol.II (1955) 356
- 19) Robineaux, R. und Lebrum-Pages, J.: Sang 21 (1950) 685

CARBOANHYDRASE



Die Aufgaben des Enzyms im Organismus sind vielfältig:

In den Lungenkapillaren macht die Carboanhydrase (CAH) mehr CO_2 für die Expiration verfügbar und beschleunigt die Aufnahme von CO_2 aus den Geweben in das Blut (19). CAH spielt also bei der Aufrechterhaltung des Säure-Basen-Gleichgewichtes eine entscheidende Rolle, auch bei der renalen Regulation dieser sog. "Basenökonomie" (6; 9; 10; 16; 20). Bei der Salzsäurebildung in der Magenwand wirkt das Ferment ebenfalls mit (20).

Man nimmt an, daß die CAH auch für die Regulierung der zentralnervösen Erregbarkeit von Bedeutung ist, die ja unter anderem auch von der CO_2 -Konzentration im Nervengewebe beeinflußt wird. Steigt die Konzentration der Kohlensäure, so nimmt die zentrale Erregbarkeit ab; sinkt sie, so nimmt die Erregbarkeit zu (1).

Die CAH ist sehr reichlich in den Erythrozyten enthalten (17). Im Serum ist das Enzym nicht nachweisbar (3).

Das Ferment ist ein Zinkprotein mit einem Molekulargewicht von etwa 30 000. CAH enthält 15 % Stickstoff und 0,164 % Zink (11) nach ABDERHALDEN (1) 0,31 - 0,34 % Zink. Entfernt oder inaktiviert man das Zink, so verliert das Enzym seine Aktivität (3).

Das pH-Optimum der CAH liegt zwischen pH 5 - 9, der isoelektrische Punkt bei pH 5,3 (1).

Es gelang, die CAH zu kristallisieren (1).

Als Hemmstoffe wirken CO , Thiocyanate, Natriumsulfid und Schwermetallsalze wie Cu, Ag, Au, Zn (12). Schon kleinste Mengen von Sulfonamiden wirken ebenfalls hemmend durch ihre freie $\text{SO}_2\text{-NH}_2$ -Gruppe (15). Auch Oxydationsmittel und zentral erregende Stoffe üben eine hemmende Wirkung aus (7; 12). Das Hämoglobin-CAH-System bleibt viele Monate lang im konservierten Blut erhalten und funktionstüchtig (5).

Normalwerte: 10 ccm Blut gesunder Menschen enthalten 14 - 18 CAH-Einheiten nach ROUGHTON und MELDRUM (1). Dividiert man die Zahl der Einheiten durch den Hämatokritwert, so erhält man den sog. CAH-Index (8). Er liegt normalerweise zwischen 0,32 und 0,39 (1).

Der Mangel an CAH bei unreifen Neugeborenen scheint direkt proportional dem Grad der Unreife des Organismus. Die Aktivität der CAH steigt langsam an im 1. Jahr und erreicht "reife" Werte im Alter von 2 - 3, spätestens 6 - 7 Jahren. Die niedrige CAH-Aktivität in den Erythrozyten unreifer Kinder steht im Gegensatz zu den fast normalen Mengen des Enzyms in den Nieren dieser Kinder (13).

Auch SHEPARD (19) stellte ein signifikantes Ansteigen der CAH mit zunehmendem Alter fest. Wenn die Menge der Erythrozyten reduziert ist, steigt der Gehalt an CAH. Die roten Blutzellen enthalten etwa 1000mal mehr CAH, als für die Lungenabatemung von CO_2 nötig wäre.

Die Aktivität des Fermentes bleibt bei jedem Individuum relativ konstant, variiert kaum von Fall zu Fall und folgt im allgemeinen dem Hämatokritwert (3).

Klinik

Es besteht keine signifikante Korrelation zwischen der Aktivität des Enzyms und der Schwere einer Krankheit, oder dem Vermögen des Serums, CO_2 zu binden (19).

Erhöhte Werte für CAH findet man bei Perniciöser Anämie (3; 19), in Ausheilung begriffenen Hämorrhagien (19) und kongenitalen Herzkrankheiten mit Zyanose (2).

Bei myeloischer Leukämie und in einigen Fällen von refraktären und hepatischen Anämien (14), sowie bei Polycythämia vera und Gelbsucht (1) war der Fermentgehalt ebenfalls gesteigert.

Findet man abnorme CAH-Werte pro Volumeinheit Vollblut, so ist das ohne pathologische Bedeutung, wenn die Hämatokritwerte entsprechende Änderungen zeigen. So ist eine abnorm hohe Fermentaktivität im Blut zyanotischer und polycythämischer Patienten auf einen entsprechend hohen Anstieg der Zahl der zirkulierenden Erythrozyten mit normalem CAH-Gehalt zurückzuführen (8).

Andererseits steht bei Anämien auf Grund von Blutverlust, Infektion, Urämie, Leberkrankheiten und Leukämie (14) die reduzierte Aktivität pro Einheit Vollblut offensichtlich in Beziehung zu den erniedrigten Hämatokritwerten und nicht zu einem CAH-Mangel im einzelnen Erythrozyten (3).

Bei Patienten mit Tuberkulose und chronischer Atmungsbehinderung infolge Asthma, Emphysem oder Stauungslunge ist die Aktivität der CAH nicht erhöht (19).

In diagnostischer und differentialdiagnostischer Hinsicht kommt dem Enzym keine Bedeutung zu, wohl aber als therapeutischem Angriffspunkt (1).

Bestimmung der CARBOANHYDRASE im Blut

ALTSCHULE, M.D. und LEWIS, H.D.: J. Biol. Chem. 180 (1949) 557

Prinzip

Die Bestimmung der Carboanhydrase-Aktivität beruht auf der manometrischen Messung (25) des bei der Reaktion in Freiheit gesetzten CO_2 und wird bei einer Temperatur von 37 Grad C durchgeführt.

Die Methode ist eine Modifikation des Verfahrens von MITCHELL und Mitarbeitern (28).

Reagentien

1. Phosphatpuffer

Lösungen von 0,2 m KH_2PO_4 und 0,2 m Na_2HPO_4 werden unmittelbar vor Gebrauch im Verhältnis 1 : 1 gemischt.

2. Bikarbonatlösung

Man löst 0,2 m Natriumbikarbonat in 0,02 m NaOH und versiegelt diese Lösung in 20 ml - Glasampullen. Kurz vor Gebrauch mischt man den Inhalt einer Ampulle mit einer genau gleichen Menge Aq. dest.

Apparatur

Die manometrische Messung wird nach einer Vorschrift von MELDRUM und ROUGHTON (27) mit der üblichen Warburg-Apparatur durchgeführt. Ein ähnliches Verfahren wurde von STADIE und Mitarbeitern (29) angegeben.

Die Gefäße werden im Wasserbad von 37 Grad C mit einer Exkursion von 30 Grad und 63 Schwingungen pro min geschüttelt. Der Grad der CO_2 -Entwicklung wird aus den manometrisch ablesbaren Druckveränderungen bestimmt. Die CO_2 -Entwicklung geht unter den Bedingungen dieser Methode so schnell vor sich, daß sie den Differenzen der Manometer-Ablesungen direkt proportional ist.

Ausführung

Man verwendet heparinisiertes venöses Blut; dieses wird in Meßkolben durch

Verdünnung mit Aq. dest. zur Hämolyse gebracht (Verdünnung auf 1 : 20, 1 : 50 und 1 : 200 in ml). 0,5 ml verdünntes Blut, 2 Glasperlen und 1,0 ml Phosphatpuffer werden in das Warburg-Gefäß eingebracht. 1 ml Bikarbonat-Lösung gelangt in den Seitenarm. Für jede Versuchsreihe wird ein Thermobarometer-Gefäß vorbereitet, das 2,5 ml Aq. dest. enthält. Das mit Reagentien und Enzym beschickte Reaktionsgefäß wird an das Manometer angeschlossen und 10 min zum Temperatúrausgleich in das Wasserbad gesetzt. Dann wird durch vorsichtiges mehrmaliges Umschwenken der Inhalt des Seitenarmes in den Hauptraum eingekippt und mit dem Schütteln begonnen.

Da die Druckänderung zu Beginn der Reaktion für eine genaue Registrierung zu stürmisch verläuft, läßt man den Manometerhahn zunächst offen - und zwar bei den Kontrollwerten (ohne Blut, vgl. unten) 90 sec, bei den Blutmessungen 1 : 200 50 sec, 1 : 50 40 sec und 1 : 20 30 sec. Nach dieser Zeit wird das Schütteln unterbrochen, das Manometer auf die Nullmarke eingestellt und die Manometerhähne geschlossen. Von jetzt ab liest man alle 30 sec 7 min lang ab und korrigiert gegen den Thermobarometerwert. (Bei Verwendung eines runden Warburg-Thermostaten braucht bei den einzelnen Ablesungen nicht gehalten zu werden.) Der Kontrollwert enthält an Stelle von Blutverdünnung eine solche von Plasma (1 : 200 mit H₂O) bei sonst gleicher Zusammensetzung. Von allen Ansätzen empfiehlt es sich, Doppel- oder Dreifachbestimmung durchzuführen.

Berechnung

Die Berechnung der Enzymaktivität erfolgt nach den Angaben von MITCHELL und Mitarbeitern (28). Sie entspricht der aus der manometrischen Messung ermittelten Geschwindigkeitskonstanten K. Um K zu erhalten, zieht man die auf den Thermobarometerwert korrigierten Höhen der Manometerablesungen jeweils voneinander ab und trägt die Logarithmen dieser Differenzen gegen die Zeit auf (26). Auf diese Weise erhält man eine Gerade, deren Steigung mit 2.303 multipliziert, der Geschwindigkeitskonstanten K entspricht. (Mit fortschreiten der Reaktion fällt die Rückreaktion mehr und mehr ins Gewicht, so daß die letzten Ablesungen für die Auswertung verworfen werden müssen.)

Die Enzymaktivität ergibt sich dann aus der Differenz (K) der Konstanten mit Enzym (K_c) und dem Kontrollwert mit Plasma (K_o) zu

$$K = K_c - K_o.$$

Zur Berechnung der Carboanhydrase-Aktivität pro ml Blut trägt man die K-Werte der verschiedenen Blutverdünnungen gegen den Logarithmus der bei dieser

Verdünnung eingesetzten Blutmenge auf. Der Schnittpunkt dieser Geraden mit der O-Linie gibt den extrapolierten Wert K für 0,5 ml unverdünntes Blut an. Durch Multiplikation mit 2 erhält man die Enzymaktivität pro 1 ml Vollblut.

Normalwerte: 1,2 - 2,6 (Mittelwert: 1,8) Einheiten/ml Blut. 1 Einheit entspricht der Geschwindigkeitskonstanten $K = 1$ unter den angegebenen Testbedingungen.

Literatur

- 1) Abderhalden, R.: Klinische Enzymologie p. 152 ff., G. Thieme Verlag 1958
- 2) Adams, F.H. und Hanson, D.M. (1950): zitiert bei 19)
- 3) Behrendt, H.: Chemistry of Erythrocytes p.193 ff., C.C. Thomas, Publ., Springfield, Ill.
- 4) Davenport, H.W. (1945): zitiert bei 10)
- 5) Denstedt, O.F.: zitiert bei 3)
- 6) Derlath, S. et al.: Münch. Med. Wschr. 38 (1956) 1300
- 7) Feldberg, W. et al. (1940): zitiert bei 10)
- 8) Hodgson, F.H.: zitiert bei 3)
- 9) Hoffmeister, W. und Krück, F.: Klin. Wschr. 13/14 (1956) 395
- 10) Hoffmeister, W. und Krück, F.: Ärztl. Wschr. 12 (1957) 49 ff.
- 11) Keilin, D. und Mann, T.: zitiert bei 3)
- 12) Kiese, M. und Hastings, A.B. (1940): zitiert bei 10)
- 13) Lambie, C.G.: zitiert bei 3)
- 14) Lewis, H.D. und Altschule, M.D. (1949): zitiert bei 3)
- 15) Mann, D. und Keilin, T. (1940): zitiert bei 10)
- 16) Maren, T.H. et al. (1954): zitiert bei 10)
- 17) Meldrum, N.V. und Roughton, F.J.W. (1932): zitiert bei 3)
- 18) Roughton, F.J.W. (1935): zitiert bei 19)
- 19) Shepard, T.H. II: Amer. J. Med. Sci. 233 (1957) 162
- 20) Wirth, W.: Dtsch. Med. Wschr. 45 (1957) 1908

Bestimmung

- 25) Dixon, M.: Manometric Methods, New York, 2nd Edition p. 11 (1943)
- 26) Guggenheim, E.A.: Phil. Mag. 2 (1926) 538
- 27) Meldrum, N.V. und Roughton, F.J.W.: J. Physiol. 80 (1933) 113
- 28) Mitchell, C.A. et al.: J. Biol. Chem. 160 (1945) 283
- 29) Stadie, W.C. et al.: J. Biol. Chem. 161 (1945) 175

CHOLESTERIN VERESTERNDES ENZYM

Bei den am Cholesterinstoffwechsel beteiligten Enzymen kann man zwei verschiedene Fermentsysteme unterscheiden: ein hydrolysierendes Ferment und ein Enzymsystem, das für die Synthese der Cholesterinester verantwortlich ist (3).

Das synthetisierende Enzym kommt außer im Serum auch in der Leber und in der Darmschleimhaut vor. Man nimmt an, daß dieses Ferment in der Leber gebildet wird. Dafür spricht auch die Beobachtung, daß bei Leberkrankheiten häufig eine Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen freiem und verestertem Cholesterin zu Gunsten der freien Form gefunden wird ("Estersturz") (1).

Bei Inkubation von Serum nimmt das freie Cholesterin ab, das Gesamt-Cholesterin hingegen bleibt unverändert (6).

Die Wirkung des Enzyms ist an die Anwesenheit von Phosphationen gebunden (3).

Hämolyse und Erhitzen auf 55 - 60 Grad C inaktivieren das Ferment, ebenso Gallensäuren (6).

Abnahme des freien Cholesterins bei Inkubation von Serum um mehr als 30 % in 24 Std gilt als normal, weniger als 30 % als pathologisch (5).

Klinik

Homologe Serum-Hepatitis sowie infektiöse Hepatitis sind in den ersten zwei Wochen von verminderten Enzymwerten begleitet. Mit fortschreitender Besserung steigt der Fermentgehalt wieder auf das Normalniveau an, und zwar vor Normalisierung des Prozentsatzes der Cholesterinester. Absinkende Werte deuten auf eine schlechte Prognose vor allem, wenn sie 10 E unterschreiten. Der Test ist besonders wertvoll dann, wenn die Kephalin-Flockungsprobe bei der Diagnose im Stich läßt (6).

Bei der chronischen Hepatitis war der Abfall der Ferment-Aktivität weniger ausgeprägt. Auch hier gelten Werte unter 10 E als prognostisch ungünstig (6).

Die Leberzirrhose zeigt teils normalen, teils verminderten Fermentgehalt im Serum (5; 6). Der Test ist hierbei mehr von prognostischem als von diagnostischem Wert.

Ein Verschlussikterus infolge Neoplasma war meist von verminderten Enzymaktivitäten begleitet (6). Erniedrigte Fermentwerte wurden auch bei Leber-

metastasen und Lymphogranulomatose in etwa einem Drittel der Fälle (1), sowie bei Kala-Azar und nephritischer Nephrose (2) beobachtet. Normale Enzymaktivität fand sich bei Cholecystitis, Cholangitis, Verschlußikterus, Cholelithiasis, infektiöser Mononukleose, Miliartuberkulose, Tetrachlorkohlenstoffvergiftung und Leberabszessen (6).

Eine gesetzmäßige Abhängigkeit der Cholesterinmenge von der jeweiligen Fermentaktivität bestand bei keiner der untersuchten Krankheitsgruppen (1).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Bestimmung des cholesterinverestenden Fermentes für die Differentialdiagnose von Leberleiden kaum von Bedeutung ist. Bei Hepatitiden und bei Zirrhosen dürfte sie jedoch in prognostischer Hinsicht wertvoll sein (1).

Bestimmung des CHOLESTERIN VERESTERNDEN ENZYMS im Serum

TURNER, K. B., MC CORMACK, G. H. jr. und RICHARDS, A.:
J. Clin. Invest. 32 (1953) 801

Prinzip

Bei Inkubation von Serum wird durch Enzymwirkung die Menge des freien Cholesterins vermindert zu Gunsten des Anteils des veresterten Cholesterins. Die Menge des Gesamt-Cholesterins bleibt gleich.

Ausführung

Das Blut wird den Patienten im Nüchternzustand entnommen. Die Menge des gesamten und des freien Cholesterins in einer Serum-Probe wird nach der Methode von SCHOENHEIMER und SPERRY (s. u.) bestimmt, und zwar bevor und nachdem das Serum bei 37 Grad C 24 Std lang inkubiert wurde.

Standardisierung

Die Differenz der Werte für freies und für das gesamte Cholesterin gibt die Menge des veresterten Cholesterins an. Mit der Inkubation fällt die Menge des freien Cholesterins gewöhnlich ab. Die prozentuale Abnahme wird berechnet und in Enzym-Einheiten ausgedrückt.

Eine Einheit wird somit definiert als die Menge der Enzym-Aktivität, welche den ursprünglichen Spiegel an freiem Cholesterin um 1 % senkt.

Die Inkubation bewirkt infolge der Fermenttätigkeit einen Abfall von 31 - 50 % (31-50 E) des freien Cholesterins, das vor der Inkubation normalerweise 40 - 75 mg % beträgt.

Normalwerte im Serum:

Gesamt-Cholesterin: 150 - 300 mg %
Cholesterin-Ester: 70 % oder mehr des Gesamt-Cholesterins
Cholesterin-veresterndes Enzym: 30 E oder mehr.

Bestimmung des freien und gebundenen Cholesterins

SCHOENHEIMER, R. und SPERRY, W.M.: J. Biol. Chem. v 106 (1934) 745

Im Prinzip besteht das Verfahren darin, das Cholesterin durch Digitonin zur Ausfällung zu bringen und anschließend den Niederschlag einer Farbreaktion zu unterziehen.

Reagentien

1. Aceton - absoluter Alkohol (1 : 1)
2. Äther.

Der Äther wird routinemäßig vorbereitet, indem man ihn mit einer Natriumsulfatlösung und anschließend mehrmals mit Wasser wäscht. Der gewaschene Äther wird über Calciumchlorid destilliert.

3. Aceton - Äther (1 : 2)
4. Digitoninlösung.

Um diese Lösung herzustellen, löst man 1 g Digitonin in 1 Liter Aqua dest. Die Lösung wird für mindestens 24 Std (besser noch länger) in den Eiskasten gesetzt und dann zentrifugiert, um den Niederschlag abzutrennen. Der Überstand wird gefiltert und auf etwa 500 ccm konzentriert. Dies geschieht am besten dadurch, daß man die Lösung in ein gewogenes 1-Liter-Gefäß gibt, das mit einer Ein- und Auslaßöffnung ausgestattet ist. Durch die Einlaßöffnung wird in etwa 2 cm Höhe über der Oberfläche der Lösung ein schneller Luftstrom wattegefiltert durch das in kochendes Wasser getauchte Gefäß geblasen oder gesaugt. Der Punkt, an welchem die notwendige Menge Wasser entfernt ist, wird mit genügender Genauigkeit bestimmt, indem man das Gefäß mit seinem Inhalt auf einer gewöhnlichen Laboratoriumswaage wiegt. Die Konzentration nimmt 3 bis 4 Std

in Anspruch. Falls ein Sediment in der konzentrierten Lösung beim Stehen entsteht, wird es abgefiltert.

5. Kaliumhydroxydlösung.

Hergestellt durch Auflösen von 10 g reiner KOH in 20 ccm Wasser.

6. Salzsäure.

Etwa 5 %ig, hergestellt durch Verdünnen von 15 ccm konz. HCl auf 100 ccm.

7. Essigsäure, 100 %ig (= Eisessig).

8. Essigsäureanhydrid (99-100 %).

9. Schwefelsäure, konz.

Spezielle Apparatur

1. Meßkolben, 5 ccm.

2. Schütteltrichter, 2,5 cm Durchmesser.

3. Filterpapier, 4,5 cm Durchmesser.

Das Filterpapier muß mit Äther oder heißem Alkohol extrahiert werden, bis es vollkommen frei von Steroiden ist.

4. Glasstäbe zum Mischen, etwa 13 cm lang.

5. Einmachgläser mit 500 oder 250 ml Fassungsvermögen, mit Gummiringen.

6. Tropfflaschen mit eingeschliffenen Pipetten und Gummikappen.

7. Glasrohre, 6-7 mm Durchmesser, zu einer feinen Kapillare ausgezogen. Die Spitze sollte etwa 8 cm lang sein.

8. Pipetten mit Gummikappen. Diese Pipetten stellt man her durch Ausziehen von Glasrohren mit 8 mm Durchmesser. Die gesamte Länge sollte etwa 13 cm betragen, und die Spitze sollte etwa 5 cm lang sein. Die Öffnung muß groß genug sein, um schnelles Füllen und Entleeren zu gestatten.

9. Wasserbad zur Aufnahme von 15 ccm-Zentrifugengläsern unter Lichtabschluß bei 25 Grad C.

10. Zeiss Pulfrich Photometer, ausgestattet mit 5 cm-Mikro-Küvetten. Auch andere Photometer, in denen Küvetten von 5 cm Schichtlänge und einem Gesamtvolumen von 2 ml verwendet werden können, sind natürlich geeignet.

Ausführung

a) Extraktion von Serum oder Vollblut

Etwa 3 ccm der Lösung: Aceton - absoluter Alkohol werden in ein 5 ccm-Meßkölbchen gegeben und über dem Wasserbad zum Kochen gebracht. 0,2 ccm Se-

rum oder Vollblut wird langsam aus einer kapillaren Pipette unter Schütteln zu der heißen Lösung hinzugegeben. Wenn man hohe Cholesterinwerte erwartet (350 mg oder mehr pro 100 ccm), sollte die Serum-Menge entsprechend reduziert werden. Nach Verschließen wird das Gefäß kräftig geschüttelt, um evtl. gebildete Proteinklumpen aufzulösen. Der Stopfen wird entfernt, abgespült und der Inhalt des Gefäßes wiederum bis zum Kochen erhitzt. Das Gefäß wird auf Zimmertemperatur abgekühlt, mit Alkohol-Aceton auf das endgültige Volumen aufgefüllt, gründlich gemischt und durch ein kleines trockenes Filter filtriert. Das Filtrat sollte völlig klar sein. Falls man die Bestimmung in doppelter Ausführung machen will, können die Mengen in entsprechendem Verhältnis vermehrt werden. Gute Resultate erhielt man mit Extrakten, ausgehend von 0,5 ml Serum, in einem Endvolumen von 10 ml.

b) Fällung des freien Cholesterins

2 ccm des Filtrates werden in ein gewöhnliches konisches 15 ccm-Zentrifugenglas pipettiert. 1 ccm der Digitoninlösung wird hinzugefügt und die Lösung gründlich mit einem Glasstab, der im Glas belassen wird, durchgerührt. Das Glas wird in ein Einmachglas (500 oder 250 ml) gesetzt, der Deckel fest darauf gelegt, und das Ganze über Nacht bei Zimmertemperatur stehen gelassen. (Für gewöhnlich genügt es, 1 Stunde lang stehen zu lassen.) Nach dem Stehen wird das Glas in einen Reagensglas-Ständer zurückgestellt, und die Lösung wird vorsichtig umgerührt, um Teile des Niederschlages, die an den Wänden des Glases hängen könnten, frei zu machen. Der Glasstab wird sorgfältig herausgenommen ohne den oberen Teil des Glases zu berühren und so abgelegt, daß von dem daran befindlichen Niederschlag nichts abgewischt wird. Dann wird das Glas bei etwa 2500 U/min zentrifugiert. Die überstehende Lösung wird langsam unter vorsichtigem Ansaugen mit der feinen kapillaren Pipette abgezogen. Man muß darauf achten, die Wand des Zentrifugenglases nicht mit der Pipette zu berühren, noch den Niederschlag aufzurühren. Wenige kleine Teilchen, wahrscheinlich Cholesterinester, schwimmen gewöhnlich auf oder nahe der Oberfläche und werden mit der Lösung abgezogen. Der Glasstab und die Wand des Glases werden mit 1,5 bis 2,0 ccm der Aceton-Äther-Lösung abgespült, am besten mit einer Tropfpipette mit Gummikappe. Der Niederschlag wird sodann gründlich aufgerührt, nach Entfernen des Glasstabes 5 min lang zentrifugiert und der Überstand wie vorher entfernt. Beim Absaugen ist zu berücksichtigen, daß die Aceton-Äther-Lösung schneller weggeht, als die visköse Wasser-Alkohol-Aceton-Lösung. Der Niederschlag wird weitere zwei Male gewaschen wie vorher, nur daß Äther statt Aceton-Äther verwandt wird. Nach-

dem die letzte Waschlösung entfernt ist, kommt der Glasstab wieder in das Glas zurück, welches sodann in ein Wasserbad von etwa 40 Grad gesetzt wird. Der Niederschlag ist in 2 oder 3 min trocken. Die letzten Ätherspuren können durch kurzes Absaugen an der Wasserstrahlpumpe entfernt werden. Die Probe ist nun für die Farbentwicklung bereit.

c) Fällung des Gesamt-Cholesterins

1 ccm des Extraktes wird in ein 15 ccm-Zentrifugenglas pipettiert und nach Zugabe von 1 Tropfen der KOH-Lösung mit einem Glasstab gut durchgerührt, der in dem Glas belassen wird. Das Glas wird in ein Einmachglas gesetzt, das in einer Schicht von ungefähr 3 cm Höhe auf 40 Grad erwärmten Sand enthält. Der Sand dient als Hitzereservoir. Der Deckel wird fest verschlossen und das Gefäß im Trockenschrank bei 37-40 Grad C eine halbe Stunde lang stehen gelassen. Nach der Hydrolyse wird das Glas abgekühlt, 1 ccm der Aceton-Alkohol-Lösung hinzugefügt, und die Lösung wird mit 5 %iger HCl (Phenolphthalein-Indikator) titriert.

Die Lösung wird nach Zugabe jedes Tropfens umgerührt und man gibt acht, daß mit Sicherheit ein definitiver Säure-Überschuß vorhanden ist. Geringe Mengen HCl haben keinen Effekt auf die Fällung des Cholesterins mit Digitonin, aber Alkali stört.

1 ccm Digitoninlösung wird zugegeben, die Lösung wird gründlich umgerührt (das suspendierte Salz löst sich sofort auf), man läßt das Glas 1 Std oder länger stehen, und der Niederschlag wird 5 min zentrifugiert und gewaschen, genau so wie es für das freie Cholesterin beschrieben wurde, abgesehen davon, daß nur eine Ätherwaschung notwendig ist.

d) Entwicklung und Ablesung der Farbe

Der getrocknete Niederschlag des Cholesterin-Digitonids wird nun in 1 ccm Essigsäure gelöst. (Falls die Menge des Niederschlages zu groß erscheint, kann man - um im Bereich der Meßbarkeit zu bleiben - im folgenden die doppelten Mengen an Essigsäure, Essigsäureanhydrid und H_2SO_4 zugeben. Wann dieser Schritt indiziert ist, kann nur die Erfahrung lehren.)

Beim Zugeben der Säure achtet man darauf, daß die Wand des Zentrifugenglases abgespült wird, falls irgendwelche Partikel des Digitonids daran hängen geblieben sein sollten. Die Auflösung wird beschleunigt durch Erwärmen des Glases in einem Wasserbad bei etwa 60 Grad und durch Umrühren.

Als nächstes wird die Temperatur des Wasserbades auf 25 Grad gebracht und die Gläser (bei Serienbestimmungen, deshalb Plural) werden in das Bad gesetzt und für wenige Augenblicke darin gelassen, um sie ins Temperatur-Gleichgewicht zu bringen. Eins wird herausgenommen und in ein Becherglas mit Wasser von 25 Grad C gesetzt. 2 ccm Essigsäure-Anhydrid werden hinzugegeben, danach 0,1 ccm H_2SO_4 konz., am besten aus einer automatischen Mikrobürette. (Die Abmessung von 0,1 ccm H_2SO_4 ist wegen des langsamen Fließens der Säure schwierig. Die Autoren empfehlen daher, die Säure durch Zählung der Tropfen zu messen. 4 Tropfen der Bürette, die sie benutzten, waren fast genau 0,1 ccm äquivalent.)

Die Lösung wird nun kräftig umgerührt (der ursprüngliche Glasstab ist immer noch in dem Glas) und das Glas wird in das Wasserbad zurückgesetzt.

Ein weiteres Glas wird in das Einzelwasserbad gebracht und die Reagentien werden wie oben zugegeben. Der Zeitraum zwischen der Zugabe der Reagentien wird so bemessen, daß nicht weniger als 27 min und nicht mehr als 37 min zwischen der Zugabe der H_2SO_4 und dem Ablesen vergehen. Mit einiger Übung nimmt das Ablesen etwa 2 min in Anspruch. Daher ist es möglich, 16 bis 18 Bestimmungen in einer Serie durchzuführen. Die Temperatur des Bades wird während des Verfahrens auf 25 Grad C gehalten.

Die Ablesung der entwickelten Farbe erfolgt gegen einen Blindwert, bestehend aus 1 ml Essigsäure, 2 ml Essigsäure-Anhydrid und 0,1 ml H_2SO_4 . Bei Verwendung des Pulfrich-Stufenphotometers wurden Küvetten von 2 ml Inhalt und 5 cm Schichtlänge benutzt. Bei der Befüllung der Meßküvette ist zu beachten, daß ein manchmal vorliegendes Sediment nicht aufgewirbelt wird. (Benutzung einer Pipette zum Überführen der Farblösung ist zu empfehlen.)

Nach der Ablesung wird die Lösung herausgegossen und die Küvette zweimal mit etwa 0,5 ccm-Mengen der nächsten unbekannten Lösung ausgewaschen, wobei man eine saubere Pipette benutzt.

Die prozentuale Lichtdurchlässigkeit wird abgelesen wie oben. Falls ein gewöhnliches Colorimeter benutzt wird, vergleicht man die unbekannte Lösung mit einer Standardlösung von wasserfreiem Cholesterin in Essigsäure. Da die Farbe nach Erreichung des Maximums langsam verblaßt, muß die Zeit der Farbentwicklung für die unbekannte Lösung und die Standardlösung annähernd die gleiche sein. Dies kann die Verwendung von mehr als einer Standardlösung während einer Serie von Ablesungen notwendig machen.

Berechnung

Für die Berechnung des Cholesteringehaltes kann der spezifische Extinktionskoeffizient des entwickelten Farbstoffes (bestimmt mit reinem wasserfreiem Cholesterin) herangezogen werden.

Die spezifische Extinktion

$$E_{sp} = \frac{E}{\text{mg Cholesterin}} = 1450$$

erwies sich konstant in einem Bereich von 0,03 - 0,15 mg Cholesterin. Hieraus ergibt sich für die Berechnung des im Ansatz vorliegenden Cholesterins die Beziehung

$$E = \frac{\text{gemessene Extinktion } E}{E_{sp}}$$

Die Größe $E = \log \frac{I_0}{I}$ kann entweder direkt an der Photometerskala abgelesen oder bei Messung der Durchlässigkeit berechnet werden nach

$$E = \frac{-\log \left(\frac{D}{100} \right)}{d}$$

(wobei D die Durchlässigkeit in % und d die Schichtdicke in cm bedeutet.)

Im Falle von Serienbestimmungen empfiehlt es sich, eine Eichkurve mit bekannten Konzentrationen einer Standardlösung von reinem, wasserfreiem Cholesterin aufzustellen.

Literatur

- 1) Abderhalden, R.: Klinische Enzymologie p.129 ff., G. Thieme Verlag (1958)
- 2) Castro Mendoza, H. und Jimenez Diaz, C.: zitiert bei 1)
- 3) Hoffmann-Ostenhof, O.: Enzymologie, Springer Verlag, Wien, (1954)
p. 186 ff.
- 4) Niefert, M.L. und Deuel, H.J. jr. (1949): zitiert bei 3)
- 5) Turner, K.B. und Pratt, V.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 71 (1949) 633
- 6) Turner, K.B. et al.: J. Clin. Invest. 32 (1953) 801

CHOLINESTERASEN

Diese Fermente spalten Acetylcholin in Cholin und Essigsäure:



Man unterscheidet eine Acetylcholin-Esterase (ACh) und eine Serum-Cholin-esterase (SCh). Beide Enzyme haben verschiedene chemische und physikalische Eigenschaften, die eine Trennung in vitro erlauben.

ACETYLCHOLINESTERASE

Das Enzym ist in allen Leitgeweben (Nerven) und reichlich in den Erythrozyten enthalten. Wie beim Leitgewebe ist das Ferment auch bei den Erythrozyten an die Zellmembran gebunden (27) und ausschließlich auf der Oberfläche lokalisiert (16).

Das ACh-System ist von Bedeutung für die Erhaltung der selektiven Permeabilität und Lebensfähigkeit der Erythrozyten (16). Hemmung der ACh verändert die Membranpermeabilität menschlicher Erythrozyten (18). Jedoch war nach Fermenthemmung keine gesteigerte mechanische Fragilität der Erythrozyten festzustellen (14).

In Leukozyten und Thrombozyten fand sich keine ACh-Aktivität. Retikulozyten haben einen höheren Gehalt an ACh als reife Erythrozyten (22; 25).

Die Aktivität des Enzyms ist enorm hoch: 1 g Nervengewebe spaltet in 1/1000 Sekunde etwa 10^{15} Moleküle Acetylcholin (1).

Die ACh ist gemeinsam mit dem Neurohormon Acetylcholin und der die Synthese des Acetylcholins vollziehenden Cholinacetylase maßgebend an der Weiterleitung und Übertragung von Nervenreizen beteiligt. Der Funktionsausfall auch nur eines dieser drei Faktoren hat den augenblicklichen Tod zur Folge (1).

Das pH-Optimum der ACh liegt zwischen 7,5 und 8,0, der isoelektrische Punkt bei 4,65 bis 4,7 (1).

Ein Geschlechts- und Altersunterschied besteht nicht (1).

SERUM-CHOLINESTERASE

Die Sch kommt vor allem im Blutserum, jedoch in geringerer Menge auch in Erythrozyten und Leukozyten (1) vor. Ihre Bedeutung ist noch unklar. Als Ursprungsort des Fermentes gilt die Leber (1; 7; 8). Seine Lebensdauer beträgt etwa 28 Tage (1).

Wahrscheinlich ist die Sch ein langsam wanderndes α_2 -Globulin mit einem Molekulargewicht von 300 000. Es macht weniger als 1/10 000 der gesamten Plasma-Proteinmasse aus (9).

Das pH-Optimum der Sch liegt bei 8,5, der isoelektrische Punkt bei 4,36 (6).

Das Enzym wird gehemmt durch Prostigmin, Mintacol, Cortison u. a. Nach Cortisontherapie beobachtet man einen beträchtlichen Abfall der Sch, Cortison scheint den Aufbau des Fermentes zu hemmen (27). Auch Phenothiazine wirken als Inhibitoren der Sch und erhöhen damit die Ansprechbarkeit des Kreislaufs auf cholinergische Reize (Acetylcholin) (7a).

Die Synthese der Sch scheint stimuliert oder gehemmt zu werden durch Faktoren, die in gleicher Weise die Albuminproduktion beeinflussen (36).

Die Werte der Sch pflegen bei ein und demselben Individuum sehr konstant zu sein. Eineiige Zwillinge weisen einen gleich hohen Sch-Spiegel auf. Tageszeitliche und jahreszeitliche Schwankungen bestehen nicht. Beim Neugeborenen ist der Sch-Gehalt noch niedrig, steigt aber im Laufe von 4 - 8 Wochen auf den für Erwachsene charakteristischen Wert an.

Der Fermentespiegel liegt beim weiblichen Geschlecht durchschnittlich um 25 % tiefer als beim männlichen. Mit zunehmendem Alter zeigt er eine gewisse Zunahme (1).

Es gibt eine große Anzahl von Stoffen, die zu einer Abnahme der Cholinesterase-Aktivität im Blut führen. Die stärksten und klinisch wichtigsten Inhibitoren der Sch und der ACh sind Physostigmin und Prostigmin (kompetitive Hemmung) sowie gewisse Alkylphosphate wie Diisopropylfluorophosphat und Tetraäthylpyrophosphat. Diese Verbindungen bewirken eine irreversible Hemmung der Cholinesterasen (1).

Beide Typen von Cholinesterasen unterscheiden sich deutlich in ihren chemischen und physikalischen Eigenschaften. Die Sch besitzt nur die Hälfte der Aktivität der ACh (4). Im Gegensatz zur Sch wird die ACh durch Kochsalz aktiviert (6). Die ACh wird durch ein Übermaß an Substrat gehemmt; die Sch

jedoch nicht (6). Beide Typen von Cholinesterasen werden durch quaternäre und tertiäre N-Basen gehemmt. Auf die ACh wirken die quaternären Basen jedoch stärker, auf die SCh hingegen die tertiären (6).

Coffein übt eine starke Hemmwirkung auf die ACh aus, dagegen nicht auf die SCh (6). Die SCh ist gegen Diisopropylfluorophosphat empfindlicher als die ACh (1).

Die Affinität der ACh zu Cholinestern ist höher als zu Nicht-Cholinestern. Die hydrolysierende Aktivität des Enzyms nimmt ab mit abnehmender Länge der Acylkette des Substrates, in der Reihenfolge: Acetyl-, Propionyl-, Butyrylcholin (30). Im Gegensatz dazu hydrolysiert die SCh sowohl Cholinester wie Nicht-Cholinester, letztere sogar in noch höherem Maße.

Die Aktivität der SCh steigt mit der Länge der Acylketten in der gleichen Reihenfolge wie die Aktivität der ACh abnimmt (30).

Beide Cholinesterasen sind sehr stabil und können im Kühlschrank lange Zeit ohne Aktivitätsverlust aufbewahrt werden. Eine Reindarstellung beider Fermente ist bisher noch nicht geglückt (1).

Es bestehen Beziehungen zwischen der Höhe der Cholinesteraseaktivität und der jeweiligen Tonuslage des vegetativen Systems (14; 16; 20). Bei ausgesprochenem Sympathicotonus ist die Fermentaktivität gesteigert; bei Parasympathicotonus nimmt sie ab (14). So führt auch Vergiftung durch "Antiesterasen" wie organische Phosphatverbindungen (Insektizide) und Kampfgase über die Blockierung der Cholinesterase-Aktivität zur Anhäufung von Acetylcholin und damit zu einer oft enormen Steigerung des Parasympathicotonus mit den entsprechenden Symptomen (1).

Klinik

Bei Leberkrankheiten findet man beinahe immer eine Verminderung der SCh (1; 7a; 19).

Durch die Schädigung der Leberzellen wird die Fermentproduktion in der Leber eingeschränkt, und es kommt daher im Serum zu einer verminderten Fermentkonzentration (24; 26).

Die Bestimmung der ChE läßt prognostische Schlüsse zu: je schwerer die Leberschädigung, um so niedriger sind also die ChE-Werte (26).

Chronische Leberleiden, wie z.B. die Leberzirrhose, zeigen dabei eine ausgesprochenere Abnahme der Fermentmenge als akute Erkrankungen, wie die akute Hepatitis und die ascendierende Cholangitis (1).

Die Werte der Serum-ChE gehen der Besserung oder Verschlimmerung des Zustandes eng parallel (26).

Verschlußikterus geht mit normalen Fermentmengen im Serum einher, es sei denn, daß es sich um Verschluß durch einen malignen Tumor handelt. Hierbei finden sich dann auch verminderte Werte (19).

Bei dekompensierten Herzkranken ist der SCh-Spiegel ebenfalls vermindert (26).

Auch bei Malignomen finden sich z. T. erniedrigte bis extrem erniedrigte Werte (16; 26; 37).

Das Ausmaß der Erniedrigung wird bestimmt von dem Fehlen oder Vorhandensein einer Begleitanämie (je stärker die Anämie, um so niedriger die Fermentwerte, vermutlich infolge ungenügender O₂-Versorgung der Leberzellen), einer fehlenden oder gleichzeitig vorhandenen Kachexie und dem Ausmaß einer Metastasierung in die Leber (26).

Diabetes mellitus geht mit normaler SCh-Aktivität einher. Jedoch führt ein coma diabeticum, auch nach erfolgreicher Therapie, nach 2 - 3 Tagen zu einem Fermentsturz, der sich dann langsam wieder ausgleicht (26).

Bei dem nephrotischen Syndrom trifft man regelmäßig erhöhte Werte im Serum an (16; 26). Die vermehrte Fermentbildung dürfte in Zusammenhang mit den Albuminverlusten durch die Nieren stehen. Um diese auszugleichen, synthetisiert die Leber diesen Eiweißkörper in großen Mengen, wobei gleichzeitig auch mehr ChE gebildet wird.

Durch die Behandlung mit Corticotropin ist es möglich, die Albuminurie zu bessern und auch den Gehalt des Serums an ChE zur Norm zurückzuführen (1).

Wenn gleichzeitig eine Leberparenchymschädigung besteht, kommt es nicht zu einer solchen Erhöhung, sondern u. U. sogar zu extrem verminderten Werten (26).

Nephritis und Niereninsuffizienz mit Urämie zeigen normale oder mäßig erniedrigte SCh-Aktivitäten. Je chronischer die Urämie verläuft, desto tiefer sinkt das Ferment ab, u. a. wegen der chronischen Stauungsvorgänge in der Leber (26).

Beim Myokardinfarkt ist der SCh-Spiegel häufig gesenkt (16). Das Ferment erreicht meist gegen Ende der ersten Woche nach dem Infarkt einen Tiefstwert und steigt dann wieder auf normale, nicht selten auch erhöhte Werte an. Lang-

dauernde Sch-Vermindernng ist oft ein prognostisch ungünstiges Zeichen (16).

Verminderte Sch-Aktivität findet sich auch

bei akuten Infektionskrankheiten (36)

nach Röntgenbestrahlung (1)

als Frühsymptom bei Schwangerschaftstoxikosen (1)

bei Asthma bronchiale (40)

Ulcus ventriculi (32)

Colitis ulcerosa (29)

Myelom (26)

Verbrennungen (16)

Schockzuständen verschiedener Genese (16)

Anaphylaktischen Reaktionen (13)

Operation (35)

chronischer Unterernährung (36)

Erhöhte Sch-Werte trifft man bei Morbus Basedow an (16).

Auch in den Erythrozyten zeigen sich pathologische Veränderungen:

Parathion, ein organisches Phosphatinspektizid, reduziert die Erythrozyten-ChE auf weniger als 10 % ihrer normalen Aktivität (3).

Konzentrationen unter 0,3 Δ pH / Std (elektrometrisch gemessen) gelten als diagnostischer Beweis für Parathion-Vergiftung (23).

Bei Anämien findet man erniedrigte Werte sowohl in den Erythrozyten als auch im Plasma. Dies gilt für perniziöse Anämie, makrozytäre und aplastische Anämien, bei Anämie durch akute Leukämie und nicht-tropischer Sprue (6). Behandelt man die Perniciosa, so steigt die Aktivität im Erythrozyten scharf an, gewöhnlich auf übernormale Werte. Mit der Normalisierung der Hämatokritwerte kehrt auch die ChE-Aktivität zur Norm zurück (6).

Sekundäre Anämien gehen mit einer wesentlichen Steigerung der Erythrozyten-ChE einher, z.B. die Anämien nach Blutverlust, die hypoplastische, mikrozytäre, Sichelzell- und chronische leukämische Anämie (6).

Der Mechanismus, welcher für diese abnormen Änderungen bei Anämien verantwortlich ist, ist noch nicht geklärt (6).

Der Gehalt der Erythrozyten an AChE wird durch Leberkrankheiten nicht beeinflusst (28).

In der Klinik hat sich die Bestimmung der Cholinesterasen bei der Diagnose und Differentialdiagnose von Leberkrankheiten bewährt. Eine Herabsetzung des Fermentgehaltes spricht für eine Parenchymschädigung der Leber, wenn eine Hypalbuminämie (ausgenommen das nephrotische Syndrom), eine schwere Anämie und ein kürzlich durchgemachtes Coma diabeticum ausgeschlossen werden können und der Patient nicht kurz zuvor mit Cortison behandelt wurde oder mit Antiesterasen in Berührung gekommen ist (1).

Von Wichtigkeit ist der Cholinesterase-Test ferner für Prophylaxe und Diagnose von Antiesterase-Vergiftungen, wie sie vor allem in Industrie und Landwirtschaft immer wieder vorkommen (39).

Vor Anwendung von Succinylcholin muß man den ChE-Spiegel des Patienten bestimmen, um solche Personen von der Behandlung auszuschließen, die die anscheinend erbliche Eigenart eines niedrigen ChE-Spiegels aufweisen und daher unerwartet stark, z. T. mit tödlich endenden Apnöen, auf Succinylcholin reagieren.

Eine wertvolle Hilfe stellt schließlich die ChE-Bestimmung bei der Myasthenia gravis zur Unterscheidung einer myasthenischen Krise von einer cholinergischen Krise dar (1).

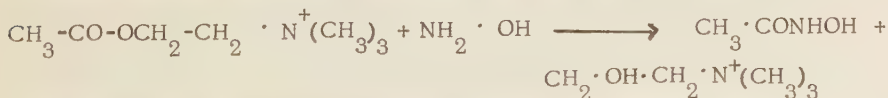
Der ACh-Titer im peripheren Blut ist anscheinend ein empfindlicher Indikator für die Aktivität des hämatopoetischen Systems, vielleicht klinisch von größerem Wert als die Zahl der Retikulozyten (33; 34).

Bestimmung der ACETYLCHOLINESTERASE im Blut

PILZ, W.: Klin. Wschr. 36 (1958) 1017

Prinzip

Die vorliegende Methode gründet sich auf das Verschwinden von Acetylcholin bei Inkubation mit esterasehaltigem biologischem Material (Blut, Erythrozyten etc.). Die Bestimmung der Acetyl-Cholinesterase (ACh) erfolgt dabei nach der Hydroxamsäuremethode durch Umsetzung des Esters mit Hydroxylamin:



Die gebildete Acet-Hydroxamsäure bildet mit Fe^{+++} einen blautoten Farbkomplex, der kolorimetrisch bestimmt werden kann.

Reagentien und Lösungen

1. Natronlauge 2,5 n :

50 g NaOH werden mit Wasser zu 500 ml gelöst.

2. Hydroxylamin:

35,0 g $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ werden mit Wasser zu 500 ml gelöst; diese Lösung ist nicht länger als 4 Wochen haltbar.

3. Eisenlösung:

337,5 g $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot (\text{NH}_4)_2 \cdot \text{SO}_4 \cdot 24 \text{H}_2\text{O}$

Mol 964, 43 (Merck) werden unter Zusatz von 25 g KNO_3 mit Wasser zu 1000 ml gelöst.

4. Citratpuffer pH 1,4 :

10,5 g Citronensäure (Monohydrat) und 4,0 g NaOH werden in wenig Wasser gelöst, 445 ml 1 n HCl zugesetzt und mit Wasser auf 500 ml aufgefüllt. Zur Prüfung verdünnt man 5 ml davon auf 50 ml, die so erhaltene Lösung muß einen pH-Wert von 1,4 haben.

5. Acetat-Puffer pH 4,62 :

200 ml 1 n Essigsäure und 100 ml 1 n NaOH werden mit Wasser zu 1000 ml verdünnt.

6. Borat-Puffer:

31,0 g $\text{B}(\text{OH})_3$ (Merck) werden in etwa 700 ml Wasser gelöst und nach Zugabe von 20 ml 1 n NaOH zu 1000 ml aufgefüllt.

Der Borat-Puffer hat keinen definierten pH-Wert, sondern wirkt als Teil der Pufferung der Substratlösung, deren Pufferzusammensetzung sich aus dem Puffer 4,62 (aus der Acetylcholin-Stammlösung) und dem Borat-Puffer ergibt. Die Substratlösung hat physiologischen pH (50).

7. Acetylcholin-Stammlösung:

0,7266 g Acetylcholinhydrochlorid werden in 50 ml Puffer pH 4,62 gelöst und mit Wasser auf 500 ml aufgefüllt.

8. Substratlösung:

20 ml Acetylcholin-Stammlösung + 20 ml Boratpuffer werden auf 100 ml aufgefüllt. Diese Lösung ist bei Zimmertemperatur einen Tag haltbar, muß einen pH-Wert von $7,3 \pm 0,2$ haben und enthält in 5 ml 8 $\mu\text{Äqu.}$ Acetylcholin.

9. Saponinlösung:

0,01 % in Wasser.

10. Physiologische Kochsalzlösung:

0,9 %ig.

Bemerkung: Die Acetylcholin-Stammlösung ist, wenn sie in Polyäthylenflaschen und im Kühlschrank aufbewahrt wird, wenigstens 6 Wochen haltbar. Die Substratlösung muß jeden Tag frisch angesetzt werden.

Ausführung

Man bezeichnet 4 Meßkolben zu 50 ml mit VE, VS und MS (V=Vergleichslösung, M=Meßlösung, E=Erythrozyten, S=Serum). In 2 Zentrifugengläschen (I und II) werden zu je 1 ml physiologischer NaCl-Lösung 0,02 ml Vollblut (Fingerbeere, Blutzuckerpipette) gefügt, kräftig umgeschüttelt und 5 min bei 3000 U/min zentrifugiert.

Die überstehende Lösung aus I wird in MS gebracht, der Rückstand aufbewahrt; die überstehende Lösung aus II wird in ein neues Zentrifugenröhrchen III gebracht, das ebenfalls aufbewahrt wird, während die Erythrozyten aus II in 1 ml Saponinlösung gelöst und dann mit 3 - 5 ml Wasser in den Meßkolben ME gespült werden.

Nun pipettiert man mit einer Vollpipette in alle 4 Meßkolben je 5 ml Substratlösung, schüttelt gut um und läßt sie genau 30 min im Brutschrank bei 37 Grad stehen. Während dieser Zeit bereitet man die nötige Menge alkalisches Hydroxylamin durch Mischen gleicher Teile 2,5 n NaOH und Hydroxylaminlösung vor. Dann pipettiert man je 5 ml davon in die 4 Meßkolben und einen mit O bezeichneten fünften Meßkolben zu 50 ml, schüttelt gut um und bringt unmittelbar darauf den Inhalt von III in den Kolben VS und spült den Rückstand in I nach Lösen in 1 ml Saponinlösung mit etwa 5 ml Wasser in VE. Die folgenden Reagentien werden in alle 5 Meßkolben gebracht: 5 ml Puffer 1, 4 und 10 ml Eisenlösung. Man füllt zur Marke auf, schüttelt gut um und läßt 15 - 20 min stehen. Dann filtriert man durch trockene, doppelt gelegte Faltenfilter in etwa 50 ml fassende Kölbchen, wobei man die ersten Filtratanteile verwirft.

Die photometrische Messung der nach obiger Vorschrift erhaltenen Filtrate, die sogleich nach der Filtration vorgenommen werden soll, wird bei 490 m μ und 20 mm Schichtdicke ausgeführt (bei Filtergeräten verwendet man die entsprechenden Filter, z.B. S 49 für Elko von Zeiss).

Berechnung

Der Berechnung liegt der bereits an anderer Stelle (51) mitgeteilte Berechnungsfaktor:

$$F = 1,04 \text{ (Definition: Ext. } \frac{490 \text{ m}}{10 \text{ mm}} \cdot F = \mu\text{Äq Ester} \cdot \text{ml}^{-1})$$

zugrunde, der für die Schichtdicke $d = 1 \text{ cm}$ gilt.

Da in diesem Falle das Gesamtvolumen 50 ml beträgt und mit 20 mm Schichtdicke gemessen wird, beträgt der Berechnungsfaktor

$$F' = \frac{F \cdot 50}{2} = 26$$

(Gleichung: $F = 1,04$

$$\text{Definition: } E_{490} \cdot F = \mu\text{Äq Ester} \cdot \text{ml}^{-1})$$

$E \cdot 26$ gibt also in diesem Falle die im Gesamtansatz vorliegende $\mu\text{Aeq. an Acetylcholin an}$.

VE gibt die insgesamt vorliegende Menge an Acetylcholin an, ME die nach der Bebrütung noch vorhandene Menge; die Aktivität des Fermentes ergibt sich demnach aus der 26-fachen Differenz der Extinktionen von VE und ME (desgleichen bei Serum mit VS und MS).

Berechnungsbeispiel:

$$E_{VE} = 0,316$$

$$E_{ME} = 0,212$$

$$\text{Differenz } E = 0,104$$

Die Aktivität der Erythrozyten-Esterase ist also

$$E \cdot 26 = 0,104 \cdot 26 = 2,73 \mu\text{Äq.}$$

Die Berechnung der Aktivität der Serum-Esterase erfolgt in derselben Weise aus den Extinktionen von VS und MS. Es bleibt zu bemerken, daß alle photometrischen Messungen gegen 0 als Leerwert durchgeführt werden müssen, da sonst bedeutende Fehler entstehen.

Die Aktivitäten werden nach den in der Arbeitsvorschrift niedergelegten Standardbedingungen in $\mu\text{Äq}$ gespaltenem Acetylcholin angegeben.

Anmerkung: Auf ähnliche Weise kann man die Acetylcholinesterase nach der Methode von De la HUERGA und Mitarbeitern bestimmen (49).

Literatur

- 1) Abderhalden, R.: Klinische Enzymologie p.42 ff., G. Thieme Verlag
(1958)
- 2) Alles, G.A. und Hawes, R.C.: J. Biol.Chem. 133 (1940) 375
- 3) Annis, J.W. und Williams, J.W.: J. Am. Med. Ass. 152 (1953) 594
- 4) Augustinsson, K.B.: zitiert bei 6)
- 5) Barron, E.S.G.: zitiert bei 6)
- 6) Behrendt, H.: Chemistry of Erythrozytes, p. 197 ff., C.C. Thomas,
Publ., Springfield, Ill.
- 7) Benard, H. et al.: zitiert bei 15)
- 7a) Benstz, W.: Klin. Wschr. (1956) 796
- 8) Brauer, R.W. und Hardenbergh, E.: zitiert bei 9)
- 9) Brown, R.K.: Klin. Wschr. (1958) 1
- 10) Greig, M.E. und Holland, W.C.: zitiert bei 6)
- 12) Harper, H.A.: Ann. Rev. Med. (1958) 463
- 13) Heim, F. (1946): zitiert bei 15)
- 14) Heinecker, R. und Losse, H.: Klin. Wschr. (1955) 870
- 15) Heinecker, R. und Mayer, I.: Klin. Wschr. (1957) 340
- 16) Literatur bei 15)
- 17) Literatur bei 11)
- 18) Hennemann, H.H. und Klaus, D.: Klin. Wschr. (1958) 516
- 19) Hinsberg, K. und Bruns, F.: Dtsch. Med. Wschr. (1957) 47
- 20) Hoff, F. und Losse, H.: zitiert bei 11)
- 22) Hutchinson, A.O. et al.: zitiert bei 15)
- 23) Johnston, J.M.: J. Pediat. 42 (1953) 286
- 24) Kommerell, B. und Franken, F.H.: Dtsch. Med. Wschr. 81 (1956) 1959
- 25) Lüthy, H.: zitiert bei 15)
- 26) Maier, E.H.: Dtsch. Med. Wschr. (1956) 1674
- 27) Maier, E.H.: Klin. Wschr. (1953) 1008
- 28) Maier, E.H.: zitiert bei 1)
- 29) Moeller, H.C. et al. (1951): zitiert bei 15)
- 30) Paleus, S.: Arch. Biochem. 12 (1947) 153 : zitiert bei 6
- 31) Rhoads, J.E. et al.: Ann. Rev. Med. (1956) 149
- 32) Rumma, K. und Sibul, J. (1943): zitiert bei 15)
- 33) Sabine, J.C. (1951): zitiert bei 12)
- 34) Scudamore, H.J. et al. (1951): zitiert bei 12)
- 35) Tonelli, L. und Pesci, A. (1954): zitiert bei 31)
- 36) Vorhaus, L.J. und Kark, R.M.: zitiert bei 12)
- 37) Vorhaus, L.J. et al. (1951): zitiert bei 18)

- 38) Wagley, P.F. und Lowe, H.J.: Bull. J. Hopkins Hospital 99 (1956) 87
- 39) Wolfsie, J.H. (1957): zitiert bei Ber. Ges. Physiologie 199 (1958) 58
- 40) Zinnitz, F. und Enzinger, H. (1950): zitiert bei 15)

Bestimmung

- 49) Huerga, J. de la, et al.: Amer. J. Clin. Path. 22 (1952) 1126
- 50) Pilz, W.: Persönliche Mitteilung
- 51) Pilz, W.: Z. anal. Chem. 162 (1958) 81

COERULOPLASMIN

Das Enzym Coeruloplasmin ist eine Oxydase und kommt im Blutplasma vor, nicht hingegen in den Erythrozyten (5). Die physiologischen Aufgaben des Fermentes sind noch nicht geklärt. Möglicherweise spielt es eine Rolle bei der Regulation der Kupferabsorption aus dem Darmtrakt (3).

Das Blut des Neugeborenen enthält nur etwa 12 % der Coeruloplasminmenge, die im Blut der Mutter vorhanden ist (1).

Das Ferment ist ein Globulin, das infolge seines Kupfergehaltes eine blaue Farbe hat. Sein Molekulargewicht beträgt 151 000. Von den Gesamtproteinen des Blutplasmas entfallen rund 0,03 %, von dem Gesamtkupfergehalt etwa 96 % auf Coeruloplasmin (1).

Klinik

Bei der Wilson'schen Krankheit (Hepatolentikuläre Degeneration) sind die Coeruloplasminwerte im Blut stark erniedrigt (2 - 19 mg). Gleichzeitig ist auch die Oxydase-Aktivität im Blut deutlich vermindert. In anderen Organen wird Kupfer hingegen in großen Mengen abgelagert. Man nimmt an, daß die Krankheit auf dem angeborenen Fehlen von Coeruloplasmin beruht (1).

Auch beim nephrotischen Syndrom fanden sich verminderte Aktivitäten für Coeruloplasmin, jedoch in geringerem Maße (5).

Chronische Infektionen wie z.B. Tuberkulose gehen mit einer gesteigerten Aktivität des Fermentes einher (68 mg % im Mittel, Schwankungsbreite 60 - 83; Oxydase-Aktivität 8,1 Mol O₂).

Im letzten Trimester der Schwangerschaft ist die Coeruloplasmin-Aktivität ebenfalls erhöht (Durchschnitt 84 ± 15 ; Oxydase-Aktivität $9,6 \pm 2,2$ Mol O₂) (5).

Neurologische Krankheiten zeigen keine verminderte Enzym-Aktivität (5).

Beim Myokardinfarkt fand man eine beträchtliche Vermehrung des Coeruloplasmins (2).

Nach AKERFELDT zeigen 70 - 89 % aller Geisteskranken (Schizophrenie, manisch-depressives Irresein, senile und andere Psychosen) einen gegenüber der Norm deutlich erhöhten Gehalt an Coeruloplasmin (1).

PEROXYDASE

Ein weiteres oxydierendes Ferment im Blute ist die häminhaltige Peroxydase, die nur in den Granulozyten enthalten ist (4). Ihre spezifische Leistung ist der dehydrierende Effekt auf Polyphenole und aromatische Amine (Benzidin) in Gegenwart von Wasserstoffsuperoxyd. Die aus Benzidin entstehenden braunen und blauen Farbprodukte zeigen das Vorhandensein des Fermentes an (4).

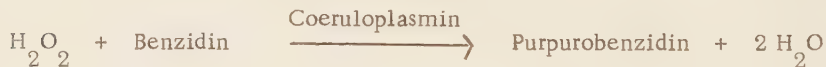
Die Bestimmung des Enzyms ist nur in isolierten Granulozyten möglich, nicht dagegen im Serum, wohin das Ferment unter pathologischen Bedingungen übertreten soll (4). Denn bei der Messung der oxydativen Fähigkeit des Serums mit der Benzidin-Methode (vgl. den vorausgehenden Abschnitt) erfaßt man vor allem die Coeruloplasmin-Aktivität.

Bestimmung des COERULOPLASMINS im Serum

HOLMBERG, C.G. und LAURELL, C.B.: Scand. J. Clin. Invest. 3 (1951) 103

Prinzip

Die Methode beruht auf der Umwandlung von Benzidin durch die Peroxydase-wirkung des Coeruloplasmins in Anwesenheit von H_2O_2 . Der gebildete Farbstoff kann colorimetrisch gemessen werden.



Reagentien

1. Barbiturat-Puffer, eingestellt auf pH 7, 2.
2. Gesättigte Lösung von Benzidin in einem Barbituratpuffer, mit einem NaCl-Gehalt von 2 % (pH 7, 2). Die Benzidinlösung enthält 3 Tropfen 33 %iges H_2O_2 auf 100 ml.

Ausführung

Die Seren werden mit dem Barbituratpuffer (pH 7, 2) verdünnt, um das pH konstant zu halten. Alle Seren werden bei -15 Grad C gefroren, um CO_2 zu entfernen.

Jede Probe enthält 1 ml Serum, 1 ml Puffer und 2 ml der Benzidinlösung.

Man inkubiert die Proben bei 37 Grad C in weiten Glasgefäßen, um volle Versorgung mit Sauerstoff sicherzustellen. Nach einer Inkubation von 16 Std Dauer werden alle Proben zentrifugiert und die Lichtabsorption im Beckman Spektrophotometer (jedes Spektralphotometer oder Kolorimeter mit entsprechendem Filter (um 600 $m\mu$) ist ebenfalls geeignet) bei 6000 Å gegen einen Blindwert abgelesen, der dasselbe Serum enthält, ohne jedoch inkubiert worden zu sein.

Bestimmung des COERULOPLASMINS im Serum

MARKOWITZ, H. et al.: J. Clin. Invest. v 34 (1955) 1498

Prinzip (10)

Man bringt gereinigtes Plasma (15) mit seinem entsprechenden Kaninchen-Antiserum zusammen und analysiert den entstehenden spezifischen Niederschlag spektrophotometrisch. Durch Bestimmung der optischen Dichte erhält man die Proteinkonzentration (hier die Coeruloplasmin-Konzentration) der untersuchten Flüssigkeit (15). Die Konzentration des Coeruloplasmins wird aus einer Eichkurve abgelesen.

Ausführung

Das Serum wird sorgfältig gesammelt, um jede Berührung mit Kupfer zu vermeiden. Nur frische Seren werden verwandt.

Immunologische Bestimmung des Coeruloplasmins:

Kaninchen werden mit Hilfe der von LIPTON und FREUND (16) angegebenen Technik mit Coeruloplasmin immunisiert. (Dieses Coeruloplasmin wurde nach der Methode von HOLMBERG und LAURELL (13) aus menschlichen Seren isoliert.)

Die Probe, welche zur Immunisation benutzt wurde, enthielt 0,23 % Kupfer und 14,0 % Stickstoff. Intrakutanes und intramuskuläres Verfahren werden gleichzeitig angewandt. Jedes Kaninchen erhält wöchentlich eine Injektion von 4 mg Coeruloplasmin, sechs Wochen lang. Sieben Tage nach der letzten Injektion läßt man es durch Herzpunktion ausbluten.

Das gesammelte Serum (= Antiserum) ergibt - selbst wenn kristallisiertes Coeruloplasmin das Antigen war - Niederschläge mit anderen gereinigten

Plasmaproteinen, wie auch mit Coeruloplasmin (15). Daher muß man das Antiserum spezifisch für Coeruloplasmin machen durch wiederholte Absorption mit dem Serum eines Wilson-Patienten, das einen besonders niedrigen Coeruloplasmin-Gehalt hat. Auf diese Weise werden die unspezifischen Begleitpräzipitationen ausgefällt und nur das Anti-Coeruloplasmin bleibt übrig (15). So wird in diesem Falle das gesammelte Antiserum vom Kaninchen zweimal mit 0,5 ml Portionen Serum eines Wilson-Patienten während 48 Std bei 0 bis 5 Grad C absorbiert und dann mit der von OUDIN (17) angegebenen Methode getestet. Eine konzentrierte Lösung Coeruloplasmin (5,25 mg pro ml) in 0,15 m physiologischer Kochsalzlösung, normalem Serum und Serum eines Wilson-Patienten werden als Antigene benutzt. Die Absorptionen mit 0,5 ml Portionen Serum des gleichen Patienten werden fortgesetzt, bis nur noch eine Zone sichtbar ist.

Die Seren werden mit Human-Coeruloplasmin geeicht unter der Annahme, daß die Kupfer-Konzentration des reinen Coeruloplasmins 0,32 % beträgt. Man bestimmt die Höhe der Antikörper mit Hilfe einer Modifikation der kolorimetrischen Methode von HEIDELBERGER und MAC PHERSON (11; 12). Ein ml einer 1 : 4 Verdünnung von Antiserum wird auf 0 Grad C abgekühlt und 1,0 bis 3,0 ml der entsprechend verdünnten Testlösung zugegeben. Das Gesamtvolumen wird mit kalter 0,15 m NaCl-Lösung auf 4,0 ml eingestellt. Man hält die Gläser 4 Tage lang auf 0 bis 5 Grad C und zentrifugiert sie dann bei 0 bis 4 Grad C. Der Niederschlag wird erst mit 3,0 ml und dann mit 2,5 ml kalter NaCl-Lösung gewaschen, danach in drei Tropfen n/10 NaOH aufgelöst und mit Wasser auf 2,5 ml verdünnt.

Die Farbentwicklung erfolgt nach der Vorschrift von HEIDELBERGER und MAC PHERSON. Die optische Dichte der Lösungen wird in einem Beckman Model B Spektrophotometer bei der Wellenlänge 650 m μ gemessen. Man bestimmt die Konzentration des Coeruloplasmins aus der Eichkurve. Die Filtrate der Präzipitinbestimmung werden auf Überschuß an Antikörper geprüft, da die Eichkurve für das Antiserum nur bei Überschuß von Antikörper gültig ist.

Normalwerte:

34 $\pm$ 4 mg Coeruloplasmin / 100 ml Serum (27 - 38 mg) oder 3,9 $\pm$ 0,7 μ M O₂ / ml / Std (Oxydase-Aktivität). (5)

Bestimmung des COERULOPLASMINS im Serum

RAVIN, H. A.: Lancet I (1956) 726

Prinzip

Die Reaktion beruht auf der oxydativen Umwandlung von Paraphenylen-diamin in ein gefärbtes Chinonderivat, dessen Extinktion photometrisch gemessen wird.

Reagentien

1. Paraphenylen-diamin (im Handel erhältlich),
wird in Aceton gelöst und in ein Salz umgewandelt, indem man tropfenweise konz. HCl zugibt, bis sich kein weiterer Niederschlag mehr bildet. Der Niederschlag wird auf Filterpapier gesammelt, mit trockenem Aceton oder Äther gewaschen und in einem Exsiccator getrocknet. Für den Versuch wird eine 0,5 %ige Vorratslösung von Paraphenylen-diamin-hydrochlorid zubereitet, die man in einem mit Stopfen versehenen Behälter kühl (bei 4 Grad C) aufbewahrt. Zunehmende Braunfärbung der Vorratslösung zeigt Zersetzung an. Jedoch kann die Vorratslösung ohne weiteres etwa eine Woche unter den beschriebenen Bedingungen aufbewahrt werden.
2. Acetapuffer 0,1 n, pH 6,0.
Herstellung: Zu 200 ml 0,1 n Natriumacetat gibt man 10 ml 0,1 n Essigsäure. Die Mischung wird kühl aufbewahrt (4 Grad C).
3. 0,1 %ige Natriumazidlösung
wird als Vorratslösung zubereitet, um die Fermentreaktion zum gewünschten Zeitpunkt zu unterbrechen. Diese Lösung erfordert keine spezielle Aufbewahrung und hält sich unbegrenzt.
4. 3 %ige NaCl-Lösung
dient zur Verdünnung der Versuchsmischung bei der Messung der Farbdichte, um die Trübung zu verhindern, die beim Verdünnen von Serum mit Wasser zu erwarten ist.

Um exakte Ergebnisse zu erhalten, verwendet man zweckmäßig frisches Serum, das frei von Hämolyse und Trübung ist; jedoch ist ein minimaler Grad von Hämolyse oder leichte Trübung tragbar.

Die Aktivität der Paraphenylen-diamin-oxydase (Coeruloplasmin) bleibt im

Serum bei 4 Grad C mindestens 2 Wochen lang intakt.

Ausführung

Alle Bestimmungen werden doppelt durchgeführt. Man erwärmt die Reagentien vor Gebrauch auf Zimmertemperatur (25 - 27 Grad C).

0,1 ml Serum wird mit einer Blutpipette sorgfältig auf den Grund eines 15 ml-Reagensglases gebracht. 1 ml der 0,5 %igen Paraphenylendiamin-Vorratslösung und 2 ml Acetatpuffer kommen hinzu.

Eine Kontrolle für nicht-enzymatische Oxydation wird zu gleicher Zeit in gleicher Weise hergestellt (sie enthält 0,1 ml Serum), jedoch unter weiterer Zugabe von 1 ml 0,1 %iger Natriumazidlösung, um die Fermentaktivität zu hemmen. Die Gläser werden einen Augenblick geschüttelt, um die Reagentien zu mischen und dann in ein Wasserbad bei 37 Grad C gesetzt. Nach einstündiger Inkubation nimmt man die Gläser heraus und gibt sofort 1 ml der 0,1 %igen Natriumazidlösung hinzu, um die Fermenttätigkeit zu unterbrechen. Dann schüttelt man kurz, um die Reagentien zu mischen.

Die Farbdichte muß innerhalb der ersten 1 oder 2 Std nach Beendigung der Inkubation bestimmt werden, weil nichtenzymatische Oxydationsvorgänge des Substrats zu einem schrittweisen Dunkelwerden der Lösung führen.

Die Versuchsmischung wird zur quantitativen Bestimmung der Farbdichte durch Zugabe von 6 ml der 3 %igen NaCl-Vorratslösung auf 10,1 ml verdünnt. Die mit Kochsalzlösung verdünnten Ansätze werden bei 530 $m\mu$ (s. Abb. 3) in Küvetten mit einer Schichtdicke von 10 mm analysiert.

Die durch Natriumazid gehemmte Kontroll-Lösung dient als Blindwert.

Berechnung

Die Aktivität des Coeruloplasmins im Serum wird ausgedrückt als der Extinktionskoeffizient der verdünnten Versuchsmischung, hergestellt und analysiert unter den oben beschriebenen Standardbedingungen.

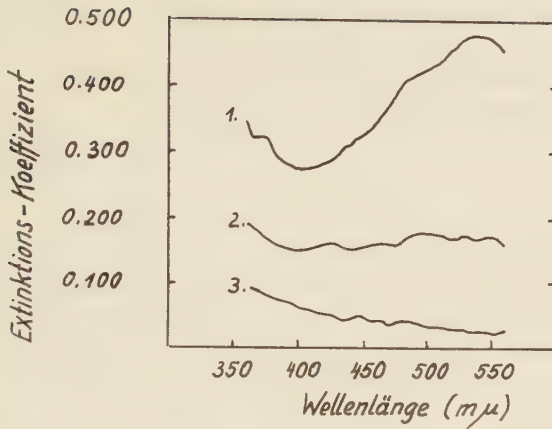


Abb. 3: Absorptionsspektren von Paraphenylen-diamin-Lösungen

1. Inkubiert mit normalem Serum
2. Inkubiert mit normalem Serum und Natriumazid
3. Frische Vorratslösung verdünnt 1 : 10

Normales Serum zeigt eine tiefe Lavendelfarbe, Serum wilsonkranker Patienten hingegen eine blasse Fleischfarbe. Der Unterschied ist so auffallend, daß man ihn auf den ersten Blick erkennt.

Literatur

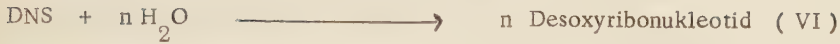
- 1) Abderhalden, R.: Klinische Enzymologie p. 112 ff., G. Thieme Verlag 1958
- 2) Adelstein, S.J. et al.: zitiert bei 1)
- 3) Cartwright, G.E. et al.: zitiert bei 1)
- 4) Henning, N. et al.: Dtsch. Arch. klin. Med. 196 (1949) 233
- 5) Markowitz, H. et al.: J. Clin. Invest. 34 (1955) 1498

Bestimmung

- 10) Gitlin, D.: J. Immunol. 62 (1949) 437 (Prinzip)
- 11) Heidelberger, M. und MacPherson, C.F.C.: Science 98 (1943) 63
- 12) Heidelberger, M. und MacPherson, C.F.C.: Science 97 (1943) 405
- 13) Holmberg, C.G. und Laurell, C.B.: Acta Chem. Scand. 2 (1948) 550

- 14) Holmberg, C.G. und Laurell, C.B.: Acta Chem. Scand. 5 (1951) 476
- 15) Kominz, D.R. und Oncley, J.L.: zitiert bei 5)
- 16) Lipton, M.M. und Freund, J.: J. Immunol. 70 (1953) 326
- 17) Oudin, J.: Ann. Inst. Pasteur 85 (1953) 336

DESOXYRIBONUKLEASE



Das Enzym spaltet Desoxyribonukleinsäuren hydrolytisch zu den entsprechenden Nukleotiden.

Es gibt zwei verschiedene Desoxyribonukleasen (DNasen), die sich hauptsächlich durch ihr verschiedenes pH-Optimum unterscheiden. Beide Fermente kommen im Blutplasma des Menschen vor. Sie weisen in den verschiedenen Lebensaltern dieselbe Aktivität auf (1). Bei unreifen Neugeborenen ist der DNase-Spiegel im Blute hoch, was für ein Zeichen mangelhafter Leberfunktion gehalten wird (6). Man nimmt an, daß die Leber die Fermente aus dem Blut entfernt (3).

Die DNase I ("neutrale DNase") hat ein pH-Optimum von etwa 7,5. Sie wird auch als Pankreasdornase bezeichnet. Das Ferment ist ein Eiweiß vom Albumintyp. Sein Molekulargewicht beläuft sich auf 60 000; der isoelektrische Punkt liegt zwischen pH 4,7 und 5,0 (1).

Aktivierend wirken auf das Enzym Magnesium (optimale Konzentration 0,003 M), Mangan (0,003 M) und die basischen Aminosäuren Histidin und Lysin (0,01 - 0,001 M).

Citrat hebt die aktivierende Wirkung des Magnesiums vollständig auf, während es den Manganeffekt nicht zu beeinflussen vermag. Hemmend wirken Heparin, Fluoride, Arsenate und Kochsalz in höherer Konzentration (2 m).

Ein Hemmstoff ist auch im Plasma enthalten. Er ist nicht dialysierbar und wird durch 5 - 10 Std langes Stehen des Serums bei 35 Grad C zerstört. Denselben Effekt hat der Zusatz von Trypsin, 5 min langes Erwärmen auf 56 Grad C oder mehrtägiges Stehenlassen des Serums bei Zimmertemperatur. Da die Aktivität der DNase durch diese Maßnahmen nicht beeinträchtigt wird, findet man in so vorbehandelten Seren eine höhere Fermentaktivität (1).

In 0,7 %iger Kochsalzlösung mit Zusatz von 0,2 % Magnesiumsulfat ist die Pankreasdornase bei Zimmertemperatur 6 - 8 Std lang haltbar. Nach 24 Std sind nur noch 2/3 der ursprünglichen Aktivität vorhanden (1).

Die DNase II ("saure DNase") hat ihr pH-Optimum bei 4,5 - 5,6. Sie wird durch Magnesium gehemmt und durch basische Aminosäuren nicht aktiviert. Das Enzym ist in den Zellkernen verschiedener Organe lokalisiert, konnte aber im Gegensatz zur DNase I noch nicht in kristallisierter Form gewonnen werden (1).

Der durchschnittliche Gehalt der DNase I beträgt beim Menschen 0,46 Einheiten (5); die Schwankungsbreite beläuft sich auf 0,076 - 1,250 Einheiten. Die Menge an DNase II liegt um etwa 25 % tiefer (11). Beide DNasen werden mit dem Harn ausgeschieden.

Klinik

Bei den meisten neoplastischen und infektiösen Prozessen sowie Stoffwechselkrankheiten bleibt das Enzym unverändert (3).

Akute Pankreatitis geht mit deutlichem und länger dauerndem Anstieg des Fermentes einher. Bei den anderen Pankreaserkrankungen sind die Werte hingegen normal (4).

Die verminderte DNase im Duodenalsaft von Patienten mit Pankreasfibrose deutet nach Ansicht von KOWLESSAR und Mitarbeitern darauf hin, daß das Pankreas eine Schlüsselstellung in der Produktion und Verteilung der DNase einnimmt. Ob die DNase eine exokrine Verdauungsfunktion hat, ist noch unsicher (4).

ABDERHALDEN empfiehlt den DNase-Test zur Diagnose der akuten Pankreatitis (2).

Bei infektiöser Hepatitis war die Aktivität der DNase I vermehrt (3; 10).

Auch größere Strahlendosen auf die Lebergegend hatten einen beträchtlichen Anstieg beider DNasen zur Folge (10).

Nach hohen Dosen von Röntgenstrahlen auf isolierte Mitochondrien und auf lymphatisches Gewebe, bes. der Milz bei Ratten, sah man eine Steigerung der DNase-Aktivität (7; 8).

Leukosen gehen mit einer deutlichen Erhöhung beider Fermente einher, besonders während der Phasen mit raschem Kernzerfall (10).

Bei experimenteller Coxsackie-Virus-Infektion war eine beträchtliche Steigerung der DNase II (bis 185 %) festzustellen. Die Zunahme der Fermentaktivität fiel zusammen mit dem Höhepunkt der Intensität der nekrotischen Pankreasschädigung. Völlige Rückbildung und Rückkehr auf normale Werte erfolgte bis zum 14. Tage (9).

Bestimmung der DESOXYRIBONUKLEASEF im Serum

ALLFREY, V. und MIRSKY, A.E.: J. Gen. Physiol. 36 (1952) 227

Prinzip

Die Bestimmung beruht auf der colorimetrischen Messung des nach Inkubation von DNS mit Serum oder Gewebehomogenisaten in Freiheit gesetzten Desoxy-ribose-Phosphates mit DISCHE's Diphenylamin-Reagens.

Reagentien

1. Substrat:

- a) Serum oder
- b) eine Lösung, die 4 mg per ml hochpolymerisiertes Natrium-Desoxy-ribonukleat enthält. Letztere Substanz wird aus Kalbsthymus gewonnen, wie an anderer Stelle beschrieben (16).

2. Puffer:

WALPOLE's Acetat-Puffer (17) wurde in dem pH-Intervall zwischen 4,0 und 5,6 benutzt. In den meisten Geweben liegt das pH-Optimum bei 5,2. Der entsprechende Puffer wird hergestellt, indem man 4,2 ml 1 m Essigsäure mit 15,8 ml 1 m Natriumacetat versetzt und mit Wasser auf 100 ml verdünnt. Am Schluß ist die Acetatkonzentration 0,2 m.

3. DISCHE's Diphenylamin-Reagens:

Zu je 40 ml einer 1 %igen Diphenylamin-Lösung in Eisessig wird 1 ml konz. H_2SO_4 hinzugefügt. Das Reagens ist nicht stabil und muß vor Gebrauch frisch bereitet werden (15).

4. Trichloressigsäure; 3,6 m.

Ausführung

Gewebe und Zellkerne werden mit kalter 0,14 m Kochsalzlösung homogenisiert, um am Schluß Konzentrationen von 3 bis 40 mg/ml, je nach Art des Gewebes, zu erhalten. Die Homogenisierung muß schnell durchgeführt werden, und zwar mit einem motor-getriebenen Teflon-Stempel, der in ein 15 mm x 125 mm Glasgefäß paßt.

Abgemessene Mengen dieses Homogenats bzw. von Blutserum (gewöhnlich 0,5 oder 1 ml) werden in Zentrifugengläser aus Kunststoff (13 mm x 95 mm) gegeben, die mit 0,5 ml Substratlösung und genügend 0,2 m Acetatpuffer für ein Endvolumen von 3,0 ml beschickt sind.

Die Lösungen werden gemischt und in einem Wasserbad bei 35 Grad C 2 oder 3 Stunden lang inkubiert.

Die Fermentreaktion wird durch Zugabe von 0,8 ml einer 3,6 m Trichlor-essigsäure (TCE) gestoppt. Dann werden die Gläser bei 10 000 U/min 15 min lang zentrifugiert und der klare Überstand in kleine Reagenzgläser gefüllt. Man erhält den Blindwert, indem man das Homogenat in ein anderes Glas gibt, das Substrat, Puffer und 0,8 ml TCE enthält. Die Mischung wird zentrifugiert und der klare Überstand abgegossen.

Um das Ausmaß der autolytischen Nuklease-Aktivität zu messen, setzt man eine zusätzliche Kontrolle an: man inkubiert das gepufferte Homogenat getrennt vom Substrat und fügt am Ende der Inkubationszeit das Substrat plus TCE hinzu.

Kolorimetrie:

0,5 bis 1,5 ml der Filtrate werden in kleine Gläser gebracht und mit H_2O auf 1,5 ml aufgefüllt. 3 ml des Diphenylamin-Reagens werden zugegeben und die Gläser für 20 min in ein kochendes Wasserbad eingebracht. Volle Farbwicklung verlangt weitere 20 min bei Zimmertemperatur. Nach dieser Zeit wird die optische Dichte bei $600\text{ m}\mu$ bestimmt. Man liest gegen einen Leerwert ab, bestehend aus 1,5 ml H_2O und 3 ml Diphenylaminlösung, die in der üblichen Weise erhitzt werden.

Zur Ablesung kann man jeden geeigneten Spektralphotometer heranziehen.

Standardisierung

Als Vergleichslösung dient eine Standardlösung von 1 ml Na-Desoxyribonukleat (15 mg bzw. 0,0123 Desoxy-P pro ml), im Gemisch mit 0,5 ml H_2O und 3 ml des Diphenylamin-Reagens. Der Desoxypentose-P-Gehalt der Standardlösung ist der Farbdichte in bestimmten Grenzen proportional, so daß der Gehalt der zu analysierenden Proben (berechnet als DNA) hieraus berechnet werden kann.

Die DNase-Aktivität wird ausgedrückt in Mikrogramm säurelöslichem Desoxypentose-P, die pro Std bei 35 Grad C in Freiheit gesetzt werden.

Literatur

- 1) Abderhalden, R.: Klinische Enzymologie p.268 ff., G.Thieme Verlag 1958
- 2) Abderhalden, R.: Klinische Enzymologie p.128, G.Thieme Verlag 1958
- 3) Brown, R.K.: Klin. Wschr. (1958) 1

- 4) Kowlessar, O.D. et al.: J. Clin. Invest. 35 (1956) 1325
- 5) Kowlessar, O.D. und Mc Evoy, R.K.: zitiert bei Abderhalden
- 6) Obrinsky, W. et al. (1955): zitiert bei 3)
- 7) Okada, S. et al.: Biochim. Biophys. Acta 28 (1958) 209
- 8) Okada, S. et al. (1957): zitiert bei 7)
- 9) Ritis, F. de et al.: Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. 32 (1956) 639
- 10) Schreier, K. et al.: Klin. Wschr. (1955) 1096
- 11) Schreier, K. et al.: zitiert bei Abderhalden

Bestimmung

- 15) Dische, Z.: Mikrochemie 8 (1930) 4
- 16) Mirsky, A.E. und Pollister, A.W.: J. Gen. Physiol. 30 (1946) 117
- 17) Walpole, G.S.: J. Chem. Soc. 105 (1914) 2501

DIASTASE (AMYLASE)

Die α -Amylase baut Stärke und Glykogen zu Maltose ab, indem sie die 1, 4- α -glukosidischen Bindungen löst (1).

Die Amylase des Serums wandert elektrophoretisch als langsames β -Globulin und stammt wahrscheinlich aus dem Pankreas (3).

Das Enzym hat ein Molekulargewicht von 45 000. Es enthält weder Phosphor noch Schwefel. Das pH-Optimum liegt bei 6, 9, der isoelektrische Punkt zwischen 4, 6 und 5, 2. Bei Zimmertemperatur ist die Amylase im pH-Bereich von 5 - 11 sehr stabil. Kochsalz und andere Chloride bewirken eine beträchtliche Aktivitätssteigerung. Schon 0, 0005 Mol Kochsalz genügen, um die halbe Maximalaktivität herbeizuführen. In chloridfreien Lösungen ist die Amylase nur sehr wenig wirksam. Für die Aktivität des Fermentes sind die primären Aminogruppen von Bedeutung, während die Hydroxylgruppen blockiert werden können, ohne daß dies zu einer Wirkungseinbuße führt (1).

Normalerweise ist die Amylase nach einigen Stunden Aufbewahrung aus dem Blutserum verschwunden. Dagegen konnte im Serum Pankreatitiskranker die Diastase in unverminderter Höhe noch nach 5 Wochen Aufbewahrung festgestellt werden. Die Ursache dieses Phänomens ist nicht klar (3).

Der Amylasegehalt des Blutes ist bei beiden Geschlechtern gleich hoch. Auch Altersunterschiede bestehen nicht, wenn man davon absieht, daß das Ferment beim Neugeborenen fehlt. Es läßt sich erst im zweiten oder dritten Monat nachweisen und erreicht dann im Verlauf des ersten Lebensjahres jene Konzentration, die während des ganzen Lebens beibehalten wird. Hunger und Durst, sowie Schlafen und Arbeit haben keinen Einfluß auf den Amylasegehalt. Auch die Art der Ernährung beeinflusst die Amylase des Blutes nicht (1). Die Ausscheidung des Fermentes erfolgt durch die Nieren. Bei Niereninsuffizienz findet sich daher eine mäßige Erhöhung des Serumfermentespiegels (8a). Man hat das Verhältnis Plasma-Amylase zu Urinamylase zu prognostischen Aussagen bei Urämie benutzt (3).

Klinik

Die Amylase im Serum ist bei vielen Krankheiten erhöht: Perforation eines Ulcus, Strangulation des Darmes, Anurie, nach Verabreichung von Opiaten und anderen Medikamenten (2; 10), akutem und chronischem Alkoholismus (1; 4), Verbrennungen 2. und 3. Grades (1), nach Operationen, vor allem im

Oberbauch (8; 11), nach Sialographie (5) und Cholangiographie, bei Mumps (13), im Asthma-Anfall (1), nach Inhalationsnarkosen (1) u. a. Auch bei parotitischer Meningoencephalitis kommt es, im Gegensatz zu lymphocytären Meningitiden anderen Ursprungs, zu einer Hyperamylasämie (7). Jedoch sieht man bei diesen Bildern niemals so starke Erhöhungen des Fermentes im Blut wie bei der akuten Pankreatitis. Der Wert der Amylase-Bestimmung für die Frühdiagnose und zur Sicherung der Diagnose einer akuten Pankreatitis ist von zahlreichen Autoren bestätigt worden (1).

Bei Ausschluß von Nieren- und Speicheldrüsenerkrankungen sowie einer medikamentös bedingten Vermehrung der Diastase spricht eine Hyperamylasämie von über 1000 Somogyi-Einheiten mit fast 100 %iger Sicherheit für das Bestehen einer akuten Pankreatitis. Das Fehlen einer Amylasevermehrung ist allerdings kein Beweis dafür, daß keine akute Pankreaserkrankung vorliegt. Gewöhnlich dauert die Hyperamylasämie nur 24 - 48 Std. Dann findet man wieder normale Werte (1). Zwischen der Höhe des Amylasespiegels und der Schwere der Pankreasstörung besteht keine Korrelation (1).

Eine weit geringere Bedeutung kommt der Amylasebestimmung bei der chronischen Form der Pankreatitis zu. Ziemlich regelmäßig kommt es jedoch beim akuten Schub zu einer stärkeren Vermehrung der Diastase im Blut (9). Der mehrfache Nachweis von Pankreasattacken mit gleichzeitig oder 6 - 12 Stunden darauf nachweisbarer Hyperamylasämie oder gesteigerter Amylasurie kann als beweisend für das Vorliegen einer chronischen Pankreatopathie angesehen werden (1). Bei unklarer Gelbsucht spricht ein erhöhter Amylasespiegel im Blut für das Vorhandensein eines Pankreaskarzinoms (6).

Bei Nierenerkrankungen lassen sich erhöhte Werte im Serum nachweisen. Gleichzeitig ist der Amylasegehalt des Harns herabgesetzt (1).

Ein erniedrigter Amylasespiegel des Blutes ist charakteristisch für Funktionsstörungen der Leber (12). So fand sich ein verminderter Fermentgehalt sowohl bei den Leberkrankheiten im engeren Sinne als auch bei Gallenblasenaffektionen, Infektionen, Pneumonien und dekompensierten Herzleiden (1). Der Mechanismus, welcher der Hypoamylasämie schon bei relativ geringen Störungen der Leberfunktion zugrunde liegt, ist unklar (1).

Schwangerschaftstoxämien gehen in schweren Fällen mit einem abnorm tiefen Amylase-Spiegel einher (1).

Bei pankreasfernen Verletzungen kommt es zu einem Absinken des Fermentgehaltes im Blut, dessen Ursache nicht bekannt ist (1).

Bestimmung der DIASTASE im Serum

Methode nach SOMOGYI (23), modifiziert von HENNING und HEINKEL
(20; 21).

Prinzip

Plasma wird mit Stärkelösung inkubiert. Nach festgesetzter Zeit bestimmt man die Menge des freigesetzten Zuckers.

Reagentien

1. Neutrale Natriumcitratlösung, 4 %ig.

2. Substrat.

0,5 %ige Aufschwemmung gewaschener Stärke (100 g Mais- oder Reisstärke mehrmals in etwa 1 Liter 0,01 n HCl und 1 Liter 0,05 %iger NaCl-Lösung waschen und lufttrocknen). 1,5 g der gewaschenen Stärke werden im Mörser zerrieben, angeteigt, in 50 ml H₂O aufgeschwemmt und zu 250 ml kochendem Aqua dest. unter heftigem Schütteln hinzugegeben. Nach kurzem Aufkochen wird die Aufschwemmung 20 min in ein siedendes Wasserbad gestellt und häufig aufgeschüttelt. Eine gute Stärkeaufschwemmung zeichnet sich durch eine relativ stabile Verteilung der Stärke aus. Vor Gebrauch ist das Substrat kräftig aufzuschütteln.

Gebrauchslösung:

2,5 Teile der Stärkeaufschwemmung werden mit 1 Teil einer schwach salzsauren Kochsalzlösung (3,0 ml n/10 HCl in 1000 ml NaCl-Lösung) versetzt.

Ausführung

0,04 ml Serum werden in 0,5 ml 4 %ige neutrale Natriumcitratlösung gegeben. (Bei sehr hohen Werten setzt man geringere Serummengen als Citratverdünnung ein.) Von einer schwach salzsauren Stärkeaufschwemmung werden je 1,5 ml zum Serum-Citrat-Gemisch gegeben und 30 min bei 37 Grad C inkubiert. Die Fermenttätigkeit wird mit der Enteiweissung nach HAGEDORN-JENSEN (s.u.) durch Zugabe einer frisch bereiteten Zinksulfat-Natronlauge-Mischung (s.u.) und dreiminütiges Einstellen in ein kochendes Wasserbad unterbrochen. Der Niederschlag wird durch Filtrierpapier (Schleicher und Schüll Nr. 595) abgetrennt und mit heißem Aq. dest. gewaschen. Im Filtrat bestimmt man die reduzierenden Substanzen entsprechend der Blutzuckerbestimmung nach

HAGEDORN und JENSEN (s.u.). Die Eigenspaltung und der Reduktionswert der Substanzen werden als Leerwert ohne Serum in gleicher Weise ermittelt. Ein Zugabe von Stärke zur Titration bei der Zuckerbestimmung erübrigt sich.

Berechnung

Der Gehalt an reduzierenden Bestandteilen wird aus der Blutzuckertabelle entsprechend dem Titrationswert abgelesen und der Leerwert abgezogen. Nach Multiplikation mit 2,5 bei 0,04 ml Serum, 5 bei 0,02 ml Serum zum Umrechnen auf 100 ml Serum wird der getrennt bestimmte Zuckerwert des Serums abgezogen. Die Aktivität drückt man in mg-% reduzierender Substanzen bezogen auf Glucose aus.

Selbstverständlich können auch andere Verfahren zur Zuckerbestimmung, wie z.B. die colorimetrische Methode von NELSON (22) herangezogen werden.

Blutzucker-Bestimmung nach HAGEDORN-JENSEN

Reagentien

1. Zinksulfatlösung:

45 g Zinksulfat werden in Wasser gelöst und auf 100 ccm aufgefüllt. Zum Gebrauch muß jedesmal ein Teil dieser Lösung auf das 100fache verdünnt werden.

2. 1/10-n NaOH,

jede Woche frisch aus halbnormaler NaOH herzustellen.

3. 1/200-n Lösung von Ferricyankalium:

1,65 g Kaliumferricyanid und 10,6 g geglähtes Natriumkarbonat werden in wenig Wasser klar gelöst und dann in einem Meßkolben auf 1000 ccm aufgefüllt. Die Lösung ist in einer braunen Flasche aufzubewahren.

4. Zinksulfat-Kochsalzlösung:

10 g Zinksulfat und 50 g Kochsalz werden in Wasser gelöst und auf 160 ccm aufgefüllt. Die Salze müssen feingepulvert und gemischt sein, ferner kann man sich die Auflösung erleichtern durch Auskochen des Gemisches mit kleinen Portionen Wasser, die dann vereinigt und auf 160 ccm aufgefüllt werden.

5. Kaliumjodid-Lösung:

12,5 g Kaliumjodid werden in Wasser gelöst und auf 100 ccm aufgefüllt.

(Die Lösung wird in einer braunen Flasche aufbewahrt.) Zum Gebrauch werden 40 Teile der Lösung (4) mit 10 Teilen der Lösung (5) gemischt. Die Mischung ist wöchentlich frisch herzustellen und in brauner Flasche aufzubewahren.

6. Essigsäurelösung:

3 ccm Eisessig werden mit Wasser auf 100 ccm verdünnt. Die Lösung muß frei von Eisen sein.

7. Stärkelösung:

1 g lösliche Stärke wird unter leichtem Erwärmen in 5 ccm Wasser gelöst und mit gesättigter Kochsalzlösung auf 100 ccm aufgefüllt.

8. 1/200-n Natriumthiosulfatlösung:

5 ccm einer 1/10-n Thiosulfatlösung, die durch Zusatz von 0,053 g wasserfreiem Natriumkarbonat haltbar gemacht wird, werden auf 100 ccm verdünnt.

9. 1/200-n Kaliumjodatlösung:

0,3566 g Kaliumjodat werden in Wasser gelöst und in einem Meßkolben auf 2000 ccm verdünnt. Diese Mischung dient zur Einstellung des Titors der Thiosulfatlösung (8), die mindestens einmal wöchentlich ausgeführt werden muß. Hierzu gibt man zu 2 ccm der Jodatlösung 2 ccm des Gemisches aus (3) und (4), 2 ccm der Essigsäure und 2 Tropfen Stärkelösung. Man titriert mit der Thiosulfatlösung bis zum Verschwinden der blauen Farbe.

Alle Reagentien müssen eisenfrei sein.

Ausführung

Man bringt in zwei Reagenzgläser aus Jena'er Glas je 1 ccm 1/10-n NaOH und je 5 ccm der verdünnten Zinksulfatlösung. Es entsteht eine kolloidale Zinkhydratlösung. Man entnimmt mit einer Pipette von 0,1 ccm 0,1 ccm Blut (bzw. eine entsprechende Menge des eiweißfreien Filtrats der inkubierten Fermentansätze), säubert die Pipette von außen anhaftendem Blut, bläst den Inhalt in die Zinklösung, spült die Pipette durch Aufsaugen und Ausblasen zweimal ab und bläst sie leer. Das zweite Reagenzglas dient als leere Kontrolle. Sie wird weiter genau so behandelt wie das erste Reagenzglas. Man stellt jetzt beide Reagenzgläser für drei Minuten in ein siedendes Wasserbad. Inzwischen werden zwei breite Reagenzgläser (30 mm Durchmesser und 100 mm Höhe) in ein entsprechendes Gestell gebracht, das man später zusammen mit den Gläsern

in siedendes Wasser stellen kann. Auf jedes Glas kommt ein kleiner Trichter (etwa 4 cm Durchmesser), der einen kleinen Bausch angefeuchteter Watte enthält. Nach drei Minuten gießt man den Inhalt der erhitzten Reagenzgläser auf das dazugehörige Filter. Das Filtrat muß vollständig klar sein. Man wäscht mit je 3 ccm Aq. dest. zweimal nach, indem man das Wasser auf das Filter gießt und gut abtropfen läßt. Jetzt entfernt man die Trichter und bringt in jedes Glas je 2 ccm (genau abmessen) Ferricyanidlösung. Man stellt hierauf das Gestell für 15 Minuten in ein siedendes Wasserbad. Nach dem Abkühlen bringt man in jedes Glas 2 ccm des Gemisches aus (3) und (4), darauf 2 ccm Essigsäurelösung und zwei Tropfen Stärkelösung. Man titriert mit der Thiosulfatlösung aus einer Mikrobürette bis zum Verschwinden der blauen Farbe. Die Berechnung geschieht nach der Tabelle (4) in folgender Weise:

Tabelle 4

Kubikzentimeter 1/200 Thiosulfat = Milligramm Traubenzucker in 100 ccm										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0,0	385	382	379	376	373	370	367	364	361	358
0,1	355	352	350	348	345	343	341	338	336	333
0,2	331	329	327	325	323	321	318	316	314	312
0,3	310	308	306	304	302	300	298	296	294	292
0,4	290	288	286	284	282	280	278	276	274	272
0,5	270	268	266	264	262	260	259	257	255	253
0,6	251	249	247	245	243	241	240	238	236	234
0,7	232	230	228	226	224	222	221	219	217	215
0,8	213	211	209	208	206	204	202	200	199	197
0,9	195	193	191	190	188	184	184	182	181	179
1,0	177	175	173	172	170	168	166	164	163	161
1,1	159	157	155	154	152	150	148	146	145	143
1,2	141	139	138	136	134	132	131	129	127	125
1,3	124	122	120	119	117	115	113	111	110	108
1,4	106	104	102	101	099	097	095	093	092	090
1,5	088	086	084	083	081	079	077	075	074	072
1,6	070	068	066	065	063	061	059	057	056	054
1,7	052	050	048	047	045	043	041	039	038	036
1,8	034	034	031	029	027	025	024	022	020	019
1,9	017	015	014	012	010	008	007	005	003	002

Man stellt zunächst fest, wieviel Traubenzucker der im Vollversuch verbrauchten Thiosulfatmenge entspricht. Von dieser Zahl wird die fiktive Menge Traubenzucker abgezogen, welche dem Verbrauch des Thiosulfats im Leerversuch entsprechen würde. Die Differenz ergibt dann den Zuckergehalt in Milligrammprozenten (siehe Tabelle 4). Selbstverständlich muß bei der Berechnung auch das Ergebnis der Titerkontrolle der Thiosulfatlösung berücksichtigt werden und, wenn nötig, eine entsprechende Korrektur gemacht werden.

Literatur

- 1) Abderhalden, R.: Klinische Enzymologie p.33 ff., G. Thieme Verlag 1958
- 2) Bogoch, A. et al. (1954): zitiert bei 11)
- 3) Brown, R.K.: Klin. Wschr. (1958) 1
- 4) Culotta, R.J. und Howard, J.M. (1954): zitiert bei 11)
- 5) Dörken, H.: Klin. Wschr. (1956) 1032
- 6) Elman, R.; Malinowski, T.: zitiert bei 1)
- 7) Gebhart, A. und Bartos, V.: Casopis Lekaru Ceskych 95 (1956) 1191
- 8) Kern, E.: Klin. Wschr. (1956) 664
- 8a) Meroney, W.H. et al. (1956): zitiert bei 3)
- 9) Muether, R. und Knight, W.A.: zitiert bei 1)
- 10) Nossel, H.L.: Gastroenterology 29 (1955) 409
- 11) Reinhold, J.G.: Ann. Rev. Med. 7 (1956) 160
- 12) Somogyi, M. et al.: zitiert bei 1)
- 13) Staub, H.: Schweiz. Med. Wschr. 24 (1956) 717

Bestimmung

- 20) Heinkel, K.: Klin. Wschr. 34 (1956) 156
- 21) Henning, N. und Heinkel, K.: Klin. Wschr. 30 (1952) 564
- 22) Nelson, N.: J. Biol. Chem. 153 (1944) 375
- 23) Somogyi, M.: J. Biol. Chem. 125 (1938) 399

ESTERASEN

LIPASE



Die Lipase spaltet Fette hydrolytisch in Glycerin und Fettsäuren.

Unter diesem Namen versteht man nach ABDERHALDEN (1) ausschließlich jenes Ferment, das Glycerinester mit langgliedrigen Fettsäuren hydrolysiert, z. B. Tripalmitin oder Triolein. (Vgl. dagegen: Aliesterase, S.

Die Lipase des Serums unterscheidet sich von anderen Lipasen durch ihre Resistenz gegenüber Atoxyl. Das Enzym kommt außerdem in den Monozyten und Erythrozyten vor.

Sein pH-Optimum liegt bei 9,0 (1).

Kupfer-, Eisen- und Kobaltionen hemmen das Ferment, ebenso die Salze der Halogene sowie die Aldehyde außer Paraldehyd, Arsen, Heparin und Chinin (1). Auch Hämoglobin wirkt als ein starker Inhibitor der Serum-Lipase (11).

Kaliumchlorid, Kaliumcyanid, Cystein sowie bei alkalischer Reaktion auch Gallensäuren, Albumin und Calciumsalze aktivieren das Enzym (1).

Das Ferment ist recht stabil (1).

Während beim Gesunden der Gehalt des Blutplasmas an anderen Enzymen in der Regel auffallend konstant zu sein pflegt, weist der Lipasespiegel stärkere Schwankungen auf (0,3 - 1,5 Einheiten pro ccm). Ein Geschlechtsunterschied besteht nicht (1).

Klinik

Bei akuter sowie chronischer und rezidivierender Pankreatitis ist der Lipasespiegel im Serum erhöht (1). Pankreaskarzinom und andere Neoplasmen sowie Ileus und Opiate führen ebenfalls zu einer vermehrten Aktivität der Blutlipase (1). Bei Mumps, Leberzirrhose und Cholelithiasis ist die Lipase bei einem Teil der Patienten leicht vermehrt. Viele andere Erkrankungen gehen mit normalen Lipasewerten einher (1).

Zentrale Bedeutung mißt KRÖNKE der Lipase für die Pathogenese der traumatischen Fettembolie bei. Das aus der Frakturstelle in die Blutbahn gelangte Fett soll zu vermehrter Lipasebildung führen. Dieser erhöhte Ferment Spiegel im Serum hat nach KRÖNKE eine Entemulgierung des Blutfettes und eine Herauslösung freien Fettes aus den Depots zur Folge ("Lipase-Entgleisung") (8).

Bei pathologischer Fetteinschwemmung in den Kreislauf (frische Unfälle und Knochennagelungen) zeigte sich andererseits ein Absinken der Serum-Lipase (1).

ALIESTERASE

Die Aliesterase ist nach ABDERHALDEN (2) ein Ferment, das Glycerinester mit kurzgliedrigen Fettsäuren, z. B. Tributyrin, zu hydrolysieren vermag. Außerdem spaltet sie die Ester mancher Monoalkohole (2).

Als Ursprungsort der Plasma-Aliesterase wird die Leber angesehen. Das Ferment kommt auch in den Erythrozyten und weißen Blutkörperchen vor, fehlt hingegen in den Thrombozyten (2).

Außer durch die andersgerichtete Substratspezifität unterscheidet sich die Aliesterase von den übrigen Esterasen auch hinsichtlich ihres Verhaltens gegenüber Effektoren: Atoxyl, Gallensäuren und Tri-o-kresylphosphat hemmen ihre Wirksamkeit (2).

Das pH-Optimum der Aliesterase liegt zwischen 8 und 9. Das Enzym ist ziemlich stabil (2).

Klinik

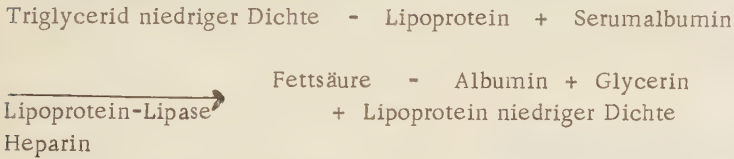
Verminderte Enzymwerte finden sich meist bei Leberzirrhose (2), Kindern mit Leukämien (4), Unterernährung, Kwashiorkor (10), fortgeschrittener Tuberkulose (12).

Bei vielen anderen Erkrankungen, insbesondere solchen von Pankreas und Leber, sind die Aliesterasewerte unverändert. So spricht ein erniedrigter Aliesterasegehalt bei normalem Ausfall der Leberfunktionsproben für das Vorhandensein eines Karzinoms. Die Bestimmung des Fermentes ist ferner wertvoll zur Beurteilung des Operationserfolges. Tritt im Anschluß an eine Operation keine Normalisierung des Enzymgehaltes ein, so ist dies ein Zeichen dafür, daß noch Malignomherde im Körper vorhanden sind. Bei Prostata- und Mamma-Karzinom erwies sich die Bestimmung der Aliesterase als unzuverlässig (2).

LIPOPROTEIN-LIPASE

Das Enzym, auch unter dem Namen "Clearing factor" bekannt, ist eine Esterase, die Mono-, Di- und Triglyceride von langer und kurzer Kettenstruktur und Fettsäuren angreift. Hingegen besitzt das Ferment keine Wirksamkeit gegenüber Laurat- und Acetatestern von β -Naphthol (S. 68).

Die Wirkungsweise des "Clearing factors" hat man durch folgende Gleichung charakterisiert:



Die Reaktion kann in Abwesenheit von Albumin ablaufen, mit einem α - oder β -Lipoprotein als Acceptor oder ohne Acceptor. Lipoproteine mit einem hohen Gehalt an Triglyceriden werden zu kleinen Lipoproteinen umgewandelt. Dagegen werden Lipoproteine mit einem hohen Gehalt an Cholesterin oder Phospholipid weniger verändert (5).

Nach Injektion von Heparin oder anderen Substanzen von hohem Molekulargewicht und stark negativer elektrischer Ladung tritt das Enzym im Plasma in größeren Mengen auf (5). Man nimmt an, daß das Heparin die Lipoproteinlipase aus den Zellen freisetzt. Ein aktivierender Effekt des Heparins wird bestritten (1).

Das Ferment kommt im Serum in der Globulinfraktion vor. Man findet es auch im nichtlipämischen Blut in kleinsten Mengen. Auch im Herz- und Skelettmuskel, Lymphdrüsen, Lunge, Milz und anderen Organen wurde es nachgewiesen (1).

Das pH-Optimum der Lipoproteinlipase beträgt bei 37 Grad C 7,35 - 7,5, nach anderen Angaben 8,2. Unterhalb von pH 6,0 und oberhalb von pH 9,0 ist das Ferment unwirksam. Es wird in vitro gehemmt durch NaCl, KCl, MgCl_2 sowie Chinin, Atoxyl und Gallensäuren (1). Auch Protamin, Histon, Toluidinblau sowie Diisopropylfluorophosphat und Heparinase wirken als Inhibitoren (9).

Über die physiologischen Aufgaben des "Clearing factors" ist noch wenig bekannt. Man vermutet, daß das Ferment für eine schnelle Eliminierung der Chylomikronen zu sorgen hat, bevor sich diese an den Gefäßwänden niederschlagen können (1).

Die Lipoproteinlipase beeinflusst sekundär den Cholesterinspiegel des Blutes. Einige Stunden nach der Klärung einer alimentären Lipämie durch Heparin-Einwirkung kommt es zu einem Absinken des Cholesterinspiegels (1).

Kongenitaler Mangel an Klärfaktor hat eine Hyperlipämie zur Folge (7).

Bei Atherosklerose sind Inhibitoren des Enzyms im Blut vermehrt. Die bei dieser Erkrankung herabgesetzte Klärfaktorwirkung würde danach weniger auf einer herabgesetzten Synthese des Fermentes als vielmehr auf einer Vermehrung seiner Inhibitoren im Blut beruhen (1). Jedoch ist noch nicht genau bekannt, welche Rolle das Enzym bei der Atherosklerose spielt (5).

Bestimmung der LIPASE im Plasma

HENNING, N. und HEINKEL, K.: Klin. Wschr. 30 (1952) 564
Modifikation der Methode von SCOZ.

Prinzip

Man läßt Blut auf emulgiertes Tributyrin einwirken und bestimmt titrimetrisch die Menge der freigewordenen Fettsäuren.

Reagentien

1. 4 %iges neutrales Natrium-Citrat
2. Wässrige AtoxylLösung, 2 %ig
3. Tributyrin
4. 0,05 %ige alkoholische Phenolphthaleinlösung
5. n/50 NaOH.

Ausführung

Zur Bestimmung der Plasmalipase genügen 2mal 0,05 ml Blut. Nach Aufschwemmung in 2mal 4 ml 4 %igem neutralem Natrium-Citrat wird abzentrifugiert und das Citratplasma in Reagenzgläser dekantiert. Eine Probe wird mit 0,3 ml einer 2 %igen wässrigen AtoxylLösung 15 min vorinkubiert. Nach Hinzugebung von 0,2 ml Tributyrin und kräftigem Schütteln zur Emulgierung wird weitere 3 Std bei 37 Grad inkubiert. Durch Hinzufügen von 10 ml einer 0,05 %igen alkoholischen Phenolphthaleinlösung wird die Fermenttätigkeit unterbrochen und die Emulsion zerstört, so daß eine klare Flüssigkeit entsteht, was eine genauere Titration ermöglicht. Die durch die Lipasewirkung freigewordenen Fett-

säuren titriert man mit n/50 NaOH bis zur schwachen bleibenden Rosafärbung.

Berechnung

Die Lipase-Aktivität wird in verbrauchten Millilitern NaOH ausgedrückt.

Bestimmung der LIPASE und ESTERASE im Serum

SELIGMAN, A. M. und NACHLAS, M. M.: J. Clin. Invest. 29 (1950) 31

Prinzip

β -Naphthyllaurat, das sowohl von Esterasen als auch von Lipase hydrolysiert wird, kann mit Hilfe einer geeigneten colorimetrischen Methode zur genauen Messung beider Enzyme benutzt werden. Das durch enzymatische Hydrolyse entstandene β -Naphthol wird in einen purpurfarbenen Azofarbstoff umgewandelt, indem zwei Moleküle mit Tetraazodi-o-anisidin gekuppelt werden. Dieser Farbstoff wird sodann mit Äthylacetat extrahiert und die optische Dichte colorimetrisch gemessen.

Reagentien

1. β -Naphthyllaurat.

Man bewahrt zweckmäßig eine fest mit Stopfen verschlossene Vorratslösung (200 mg auf 100 ccm Aceton) im Kühlschrank auf.

Synthese des β -Naphthyllaurates: (21)

46 g Laurinsäure und 40 ccm Thionylchlorid werden in einem offenen Erlenmeyer bis zur Auflösung der Säure erhitzt. Man hält die Mischung weitere 10 min auf einer Temperatur nahe dem Kochpunkt und entfernt dann das überschüssige Thionylchlorid im Vakuum (ohne Siedekapillare). β -Naphthol (29 g) wird nach und nach zu dem heißen Säurechlorid hinzugegeben. Wenn die Reaktion nachgelassen hat, fügt man 20 ccm trockenes Pyridin zu und erhitzt die Mischung 15 min lang auf 80 - 90 Grad C. Die heiße Lösung wird vorsichtig mit absolutem Äthanol versetzt, bis die zugefügte Menge 400 ccm erreicht hat. Die Lösung wird im Eisbad gekühlt, der Ester auf der Nutsche gesammelt und mit absolutem Methanol gewaschen.

2. Tetraazo-di-o-anisidin (im Handel "Naphthanil-Diazoblau").

Das Pulver wird unmittelbar vor Gebrauch in kaltem Wasser aufgelöst.

3. Natrium-Taurocholat

Eine Lösung (8×10^{-2} M) wird durch Auflösen von 890 mg in 100 ccm Wasser zubereitet und einen Monat lang bei 4 Grad C aufbewahrt.

4. 0,1 m Veronalpuffer (pH 7,4)

wird hergestellt, indem man 58 ccm einer Lösung, die 10,3 g Natrium-diäthyl-barbiturat in 500 ccm Wasser enthält, mit 42 ccm 0,1 m HCl mischt (20). Bei 4 Grad C ist die Mischung einen Monat lang haltbar. Nach längerer Aufbewahrung oder bei Zimmertemperatur wurde eine nicht-enzymatische Hydrolyse des Substrates in Kontrollansätzen beobachtet.

5. Trichloressigsäurelösung (40 %)

6. Äthylacetat

Ausführung

Geronnenes Blut (5 ccm) wird 10 - 15 min lang bei 2000 U/min zentrifugiert. Die Bestimmungen werden doppelt ausgeführt. Mit einer 0,2 ccm Pipette wird Serum in jedes von vier Reagenzgläsern gebracht, von denen zwei je 1 ccm Wasser, die anderen zwei je 1 ccm der Natrium-Taurocholat-Lösung enthalten. Ein fünftes Glas, mit 2 ccm Wasser gefüllt, dient als Kontrolle.

Die Substratlösung wird zubereitet, indem man 5 ccm der Vorratslösung (Naphthyllaurat in Aceton) durch eine eingetauchte Pipette unter Schütteln in eine wässrige Mischung von 10 ccm Veronalpuffer und 35 ccm Wasser einbringt. Es entsteht eine getrübbte Lösung, die 0,2 mg/ccm enthält. Diese kolloidale Suspension (5 ccm) wird in jedes der oben erwähnten fünf Reagenzgläser eingebracht. Man inkubiert 5 Std lang bei 37,5 Grad C.

Danach wird in jedes Glas 1 ccm einer kalten Lösung Tetraazodi-o-anisidin hinzugegeben. (Die Lösung wird unmittelbar vor Gebrauch durch Auflösen von 40 mg des Pulvers in 10 ccm Wasser hergestellt.) Darauf folgt nach 2 min 1 ccm 40 %ige Trichloressigsäurelösung. Nun wird der rote Farbstoff durch kräftiges Schütteln mit 10 ccm Äthylacetat pro Ansatz extrahiert. Die Gläser werden 5 min lang zentrifugiert. Dann bringt man jeweils 5 ccm der klaren, rot gefärbten Lösungsmittel-Schicht mit einer Pipette in eine Colorimeterzelle. Man bestimmt die Farbdichte mit einem photoelektrischen Colorimeter (Klett) (Schichtdicke 1 cm) durch einen Filter von 540 m μ .

Die Farbdichte der Gläser ohne Taurocholat ist mit normalem Serum größer

als die der Gläser mit diesem Reagens, das die Esterase teilweise hemmt. Die höheren Werte, die man in Anwesenheit von Taurocholat erhält, sind ein Maß der unspezifischen Esterase-Aktivität. (Eine schnellere Bestimmung der Esterase-Aktivität (20 min) ist mit dem Substrat β -Naphthylacetat möglich (22)).

Ist jedoch Lipase im Serum vorhanden, so ist die Farbdichte der Taurocholat enthaltenden Gläser größer als die der Gläser ohne Taurocholat, da diese Substanz die Lipase-Aktivität stimuliert. Die Differenz in der Farbdichte der Gläser steht in Beziehung zu der Menge der Lipase ohne Rücksicht auf den Esterasegehalt.

Standardisierung

Die Farbdichte wird mit Hilfe einer Eichkurve (s. d.) in mg Naphthol umgewandelt.

Man stellt die Eichkurve her durch Einsetzen verschiedener Mengen von β -Naphthol als Substratlösung und Durchführung der oben genannten Vorschrift.

Eine Lipase-Einheit wird somit definiert als diejenige Enzymmenge, welche in Gegenwart von Natrium-Taurocholat 0,01 mg Naphthol aus β -Naphthyl-laurat in 5 Std bei 37,5 Grad C freisetzt, abzüglich der Menge, welche von der in derselben Menge Serum vorhandenen Esterase in Freiheit gesetzt wird.

Normales Serum enthält keine meßbaren Mengen Lipase. Die Esterase-Aktivität hingegen belief sich auf 0,03 - 0,1 mg Naphthol pro 0,2 ccm Serum.

Bestimmung der ESTERASE (CARBESTERASE) im Serum

RUPPERT, F. : Ärztl. Labor. 2 (1956) 168

Prinzip

Die Esterase-Aktivität wird gemessen an der Freisetzung von Phenolphthalein aus Phenolphthalein-Dibutyrat, dessen Rotfärbung im alkalischen Milieu leicht colorimetrisch bestimmt werden kann.

Reagentien

1. Borax-Phosphatpuffer (n. KOLTHOFF), pH 9,0

a) 19,1 g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ (Borax) ad 1000,0 ml H_2O

b) 13,62 g KH_2PO_4 (n. SÖRENSEN) ad 1000,0 ml H_2O

Zur Herstellung des gebrauchsfertigen Borax-Phosphatpuffers werden 170 ml Lösung B mit Lösung A ad 1000,0 ml aufgefüllt. pH = 9,0

2. Phenolphthaleindibutyrat als Substrat (50 mg in 10 ml Methanol)

Die Substratlösung ist kühl aufzubewahren und im Eisschrank ca. 8 - 14 Tage haltbar. Gibt sie bei der Fermentbestimmung im Leerwert eine Extinktion über 0,12, dann muß sie erneuert werden.

Herstellung von Phenolphthaleindibutyrat:

10 g Phenolphthalein werden in einer Mischung von 80 ml trockenem Benzol und 15 ml trockenem Pyridin in einer Schliffapparatur mit Chlorcalciumröhrchen und Rückflußkühler auf dem Wasserbad gelöst. Man läßt dann tropfenweise eine Lösung von 8,0 g Butyrylchlorid (hergestellt aus Buttersäure und Phosphoroxychlorid) in 10 ml Benzol zufließen und erhitzt weiter 4 - 5 Std am Rückfluß. Es hat sich inzwischen ein hellbräunlicher Bodensatz im Kolben gebildet. Nach Erkalten werden Benzol und Pyridin im Vakuum bis zur Sirupkonsistenz des Kolbeninhaltes abgedampft und der Rückstand unter Erwärmen in Äthylalkohol gelöst. Durch Abkühlen auf -10 Grad C erhält man einen zunächst noch gelbbraunen kristallinen Niederschlag, den man durch 2 - 3maliges Umkristallisieren aus Äthylalkohol bei -10 Grad C rein weiß und frei von Phenolphthalein bekommt. Sm. des reinen Phenolphthaleindibutyrates 90 - 91 Grad.

Ausbeute: 9 - 10 g.

3. 20 %ige Trichloressigsäure

4. 10 %ige NaOH

5. 0,2 m Glykokollpuffer, pH 11,2

15,010 g Glykokoll werden zusammen mit 11,70 g NaCl in Wasser gelöst und ad 1000 ml aufgefüllt. Davon nimmt man 500 ml, gibt 100 ml 1 n NaOH dazu und füllt mit Wasser wieder ad 1000 ml auf. Dieser Puffer besitzt ein pH von 11,25 und ist für die Anfärbung der Phenolphthaleinlösungen gebrauchsfertig.

Die Carbesterase ist relativ stabil und kann auch in Mischung mit alkal. Puffer (siehe Mikroverfahren) ruhig 48 Std bis zur Verarbeitung bei Zimmertemperatur stehen bleiben, ohne mehr als 10 % an Aktivität zu verlieren. Bei längerer Aufbewahrung ist immer die vorherige Abtrennung der Blutzellen zu raten, da diese selbst reichlich Carbesterase enthalten.

Ausführung

0,1 ml Kapillarblut werden in einem Zentrifugenglas in 2,5 ml Borax-Phosphatpuffer (Lösung 1) aufgeschwemmt und scharf zentrifugiert. Nach Abdekantieren des klaren, nicht hämolytischen Plasma-Puffergemisches pipettiert man von diesem in 2 Zentrifugengläser von je 1,0 ml und gibt dazu genau je 0,1 ml Substrat (Lösung 2). Als Leerwert für die ganze Versuchsreihe läuft ein Zentrifugenröhrchen mit 1,0 ml reinem Borax-Phosphatpuffer (Lösung 1) und 0,1 ml Substrat (Lösung 2) mit. Man verschließt die Röhrchen dicht mit Kunststoffkappen und hält den ganzen Ansatz 24 Std bei genau 37 Grad C (+ 0,2 Grad C) im Wasserbad. Dann gibt man zu den Röhrchen des Fermentansatzes je 1,0 ml reinen Puffer (Lösung 1), zu dem Leerwert dagegen 1,0 ml Serum-Puffermischung (herzustellen aus 0,1 ml Serum in 5,0 ml Puffer (Lösung 1), im Eisschrank eine Woche vorrätig zu halten). Nun versetzt man alle Gläser mit je 1,0 ml 20 %iger Trichloressigsäure und läßt ca. 10 min stehen. Dann zentrifugiert man scharf und pipettiert von der klaren, abdekantierten Flüssigkeit je 2,0 ml in ein 10 ml-Meßkölbchen, neutralisiert mit Natronlauge bis zur beginnenden Rosafärbung und füllt die Kölbchen mit dem Glykokoll-Natronlaugepuffer (Lösung 5) bis zur Marke auf. Messung der Rotfarbe, die mindestens eine Std stabil bleibt, am Stufenphotometer oder Elko II (Zeiss) in 2 cm-Küvetten bei Filter S 55 gegen den Leerwert.

Man kann die Bestimmung noch genauer gestalten, indem man jeweils 2 Leerwerte mitlaufen läßt, um auch einen Mittelwert des Leerwertes zu erhalten. Dann liest man am zweckmäßigsten alle Lösungen (sowohl Leerwerte als auch Hauptwerte) gegen Wasser ab und bildet die Differenzen zwischen Mittelwert des Fermentansatzes und Mittelwert des Leerwertes.

Standardisierung

Aus der so erhaltenen Extinktion des Fermentansatzes werden an Hand der Eichkurve die Gamma Phenolphthalein ermittelt, die sich im Reaktionsansatz durch die Esterasewirkung gebildet haben. Um nicht den Begriff der Fermenteinheit für diese Methode festlegen zu müssen, soll der abgelesene Phenolphthaleingehalt des Fermentansatzes direkt als Carbesterasewert bezeichnet werden.

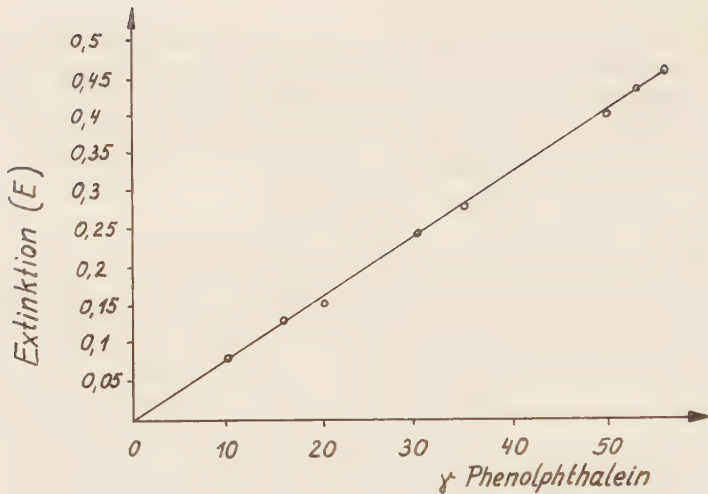


Abb. 5

Herstellung der Eichkurve (Abb. 5):

Zur Umrechnung der Extinktionswerte auf die Menge abgespaltenen Phenolphthaleins muß man sich unter den gleichen Bedingungen, wie sie im Hauptversuch der Fermentanalyse bestehen, eine Eichkurve aufstellen. Man bereitet sich zu diesem Zweck zunächst eine Plasma-Pufferlösung (1 ml Vollblut in 25 ml Borax-Phosphatpuffer pH 9,0, abzentrifugieren) und gibt davon in ein Zentrifugenglas 1 ml. Es werden dazu dann noch weiter 1 ml reinen Puffers und 0,1 ml methylalkoholische Phenolphthaleinlösung pipettiert (enthaltend 10 - 60 Gamma). Zur Proteinfällung fügt man 1 ml 20 %ige Trichloressigsäure dazu, zentrifugiert und dekantiert. 2 ml des klaren Abdekantierten werden wie beim Fermentversuch angefärbt (siehe Mikroverfahren).

Normalwerte bei Erwachsenen (Durchschnitt) : 50,5 (45-60) (ausgedrückt in Gamma abgespaltenen Phenolphthaleins)

Frauen: 50,1 Gamma

Männer: 51,1 Gamma

Mittelwert für Kinder: 48,3, also ca. 4 % niedriger.

Literatur

- 1) Abderhalden, R.: Klinische Enzymologie p.146 ff., G. Thieme Verlag (1958)
- 2) Abderhalden, R.: Klinische Enzymologie p.149 ff., G. Thieme Verlag (1958)
- 3) Abderhalden, R.: Klinische Enzymologie p.136 ff., G. Thieme Verlag (1958)
- 4) Literatur bei 2)
- 5) Brown, R.K.: Klin. Wschr. (1958) 1
- 6) Brown, R.K. et al. (1955): zitiert bei 5)
- 7) Engelberg, H. (1955): zitiert bei 5)
- 8) Krönke, E.: Langenbecks Arch. klin. Chir. 283 (1956) 466
- 9) Robinson, D.S. und French, J.E. (1957): zitiert bei 5)
- 10) Srinivasan, P.R. und Patwardhan, V.N.: zitiert bei 2)
- 11) Tauber, H. : zitiert bei 1)
- 12) Tuba, J. und Hoare, R.: zitiert bei 2)

Bestimmung

- 20) Michaelis, L.: J. Biol. Chem. 87 (1930) 33
- 21) Nachlas, M.M. und Seligman, A.M.: J. Biol. Chem. 181 (1949) 343
- 22) Seligman, A.M. et al.: Am. J. Physiol. 159 (1949) 337

FERMENTE DES GALAKTOSE-STOFFWECHSELS

1. GALAKTOSE-1-PHOSPHAT-TRANSFERASE

Das Enzym ist verantwortlich für die Umwandlung von Galaktose-1-phosphat in Glucose-1-phosphat:



Die G-1-P-Transferase wurde von KALCKAR und Mitarbeitern in menschlichen Erythrozyten nachgewiesen (3).

Auch in der Leber ist das Ferment enthalten.

Im Serum fand sich das Enzym nicht.

Klinik

Fehlt das Enzym, so kommt es zu pathologischen Erscheinungen, die unter dem Namen "Galaktosämie" bekannt sind. Die Galaktose häuft sich im Blut an und wird im Urin ausgeschieden (1). Diese Enzymopathie, die familiär gehäuft auftritt, wird wahrscheinlich rezessiv und nicht-geschlechtsgebunden vererbt (5). Das klinische Bild ist gekennzeichnet durch Hepatomegalie mit Gelbsucht, Erbrechen, Diarrhöen, Galaktosurie und Störung der geistigen Entwicklung.

Bei frühzeitiger Erkennung der Galaktosämie, d. h. in den ersten zwei Lebensmonaten, und entsprechender Diät (lactose- und galaktosefrei) ist eine normale Entwicklung der Kinder möglich (2).

Neuerdings fanden HOLZEL und Mitarbeiter, daß Galaktose-1-phosphat ein kompetitiver Hemmstoff für die normale phosphorylierende Aktivität der Phosphoglukomutase ist, und daß Anhäufung von Galaktose-1-phosphat zu einer Hemmung des normalen zellulären Oxydationsmechanismus führt (1).

SCHWARZ und Mitarbeiter berichteten, daß der Sauerstoffverbrauch der Erythrozyten bei Galaktosämie herabgesetzt ist (6).

2. GALAKTOKINASE

Das Ferment katalysiert die Phosphorylierung der freien Galaktose zu Galaktose-1-phosphat. ATP liefert die Energie für diese Reaktion.



Der Gehalt der Erythrozyten an Galaktokinase ist bei der Galaktosämie normal (3).

3. GALAKTOWALDENASE

Das Enzym wurde von LELOIR entdeckt und ist eine Isomerase (4). Es katalysiert folgende reversible Reaktion, bei der DPN als Coferment dient:



Bestimmung der Fermente des Galaktose-Stoffwechsels im Blut

KALCKAR, H. M., ANDERSON, E. P. und ISSELBACHER, K. J.:
Biochim. et Biophys. Acta 20 (1956) 262

Ausführung

Intakte Erythrozyten werden mit freier Galaktose 3 Std lang bei 37 Grad C inkubiert, um ein Maß für die Anhäufung von α -Galaktose-1-phosphat (Gal-1-P) zu bekommen. Zur Aktivitätsbestimmung der Phospho-Galaktose-Uridyl-Transferase (PGal-Transferase) inkubiert man Hämolysate roter Blutzellen oder gefrorenes und wieder aufgetautes Vollblut 30 min bei 37 Grad C mit den verschiedenen Substraten. Eine Probe wird mit Gal-1-P inkubiert, die zweite mit Uridindiphosphoglucose (UDPG) allein. Die fehlende Komponente wird nach Enteiweißung hinzugegeben. Die dritte Probe wird mit beiden Substraten inkubiert.

Zur Messung der Pyrophosphat-Transferase verfährt man in gleicher Weise, nur wird anorganisches Pyrophosphat (PP) an Stelle von Gal-1-P eingesetzt.

Hämoglobin und andere Eiweiße werden durch Zugabe des gleichen Volumens von 90 %igem Äthanol, welches 10 % Chloroform (12) enthält, denaturiert und ausgefällt. Dann bringt man die entsprechenden Substrate, welche während der Inkubation weggelassen worden waren, in die verschiedenen Kontrollproben ein.

Das Koagulum wird mit dem halben Volumen 30 %igen Äthanols reextrahiert. Man zentrifugiert die kombinierten Filtrate bis zum Klarwerden der Lösung und extrahiert sie mit peroxydfreiem Äther, welcher Äthanol und Chloroform entfernt. Der Rest wird dann im Vacuum auf ein geeignetes Volumen eingedampft.

Die enzymatische Bestimmung des Gal-1-P in den Filtraten nach der Inkubation der roten Blutzellen mit freier Galaktose wird nach folgendem Prinzip durchgeführt:

Wenn Gal-1-P in Gegenwart fraktionierter PGal-Transferase aus der Leber mit UDPG inkubiert wird, und Phosphoglucomutase, 6-Phosphoglucose-Dehydrogenase und TPN als Indikatorsystem für α -Glucose-1-Phosphat (G-1-P) oder Glucose-6-phosphat (G-6-P) hinzugegeben werden, entsteht für jedes Mol Gal-1-P durch Reaktion mit UDPG 1 Mol G-1-P (16). Die Bestimmung wird etwas erschwert durch einen hohen Blindwert an G-6-P in den Blutfiltraten.

Zur enzymatischen spektrophotometrischen Bestimmung des während der Inkubationen gebildeten oder verbrauchten UDPG gibt man entsprechende Mengen der konzentrierten Filtrate zu einem Puffer (pH 8,5), welcher Cystein und als Indikatorsystem DPN und UDPG-Dehydrogenase (17) enthält. Für die zusätzliche Bestimmung der UDP-Galaktose (UDPGal) bringt man gereinigte Galaktowaldenase (13; 14) als letzte Komponente ein. Mit dieser Methode kann man beide Transferasen in beiden Richtungen bestimmen. Die genaue Bestimmungsmethode ist noch nicht veröffentlicht (10).

Galaktowaldenase ist in Hämolysaten nicht nachweisbar, wenn man nicht $0,5 - 1 \mu\text{M}$ DPN pro 5 ml Hämolysat zugibt. Tut man dies, so läßt sich das Ferment sowohl bei normalen als auch bei galaktosämischen Individuen nachweisen (10).

Gewinnung der Reagentien

Gal - 1 - P : nach COLWICK (11)

G-1-P und

UDPG sind im Handel erhältlich (Sigma Chemical Company).

UDP-Galaktose nach (13).

UDPG-Dehydrogenase aus Leber (15; 18).

Galaktowaldenase aus Kalbsleber (14).

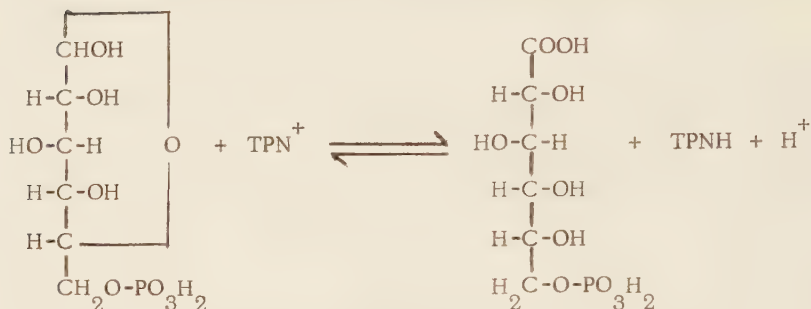
Literatur

- 1) Abderhalden, R.: Klinische Enzymologie p.177 ff., G.Thieme Verlag
(1958)
- 2) Literatur bei 1)
- 3) Kalckar, H.M. et al.: zitiert bei 1)
- 4) Leloir, L.F.: Arch. Biochem. Biophys. 33 (1951) 186
- 5) Lippman, D. et al.: zitiert bei 1)
- 6) Schwarz, V. et al.: zitiert bei 1)

Bestimmung

- 10) Anderson, E.P., Kalckar, H.M. und Kurahashi, K.: (unveröffentlicht)
- 11) Colowick, S.P.: J. Biol. Chem. 124 (1938) 557
- 12) Keilin, D. und Mann, T.: Biochem. J. 34 (1940) 1163
- 13) Maxwell, E. et al.: Biochem. Biophys. Acta 18 (1955) 389
- 14) Maxwell, E. : (unveröffentlicht)
- 15) Maxwell, E. et al.: (unveröffentlicht)
- 16) Munch - Petersen, A. et al.: Kgl. Danske Videnskab. Selskab, Biol. Med.
7 (1955) 22
- 17) Strominger, J.L. et al.: J. Am. Chem. Soc. 76 (1954) 6411
- 18) Strominger, J.L. et al.: in S.P. Colowick und N.O.Kaplan (eds):
Methods in Enzymology, Vol.III, Academic Press, Inc., New York,
(1956)

GLUCOSE-6-PHOSPHAT-DEHYDROGENASE



Glucose-6-phosphat

6-Phosphogluconsäure

Das Enzym, auch Zwischenferment genannt, spielt eine Rolle im Glutathion-Stoffwechsel der Erythrozyten und bei der Bildung von Ribosephosphaten, den Bausteinen der Nukleotide (3; 8).

Auch für die Erzeugung des als H-Donator wichtigen TPNH für reduktive Stoffwechselprozesse (Lipidsynthese etc.) kommt der Zwischenfermentreaktion hohe physiologische Bedeutung zu.

Die Aktivität der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G-6-PD) im Blut ist auf die Erythrozyten beschränkt.

Der Fermentspiegel in den Erythrozyten ist sehr hoch bei Geburt und bleibt etwa 35 Wochen lang gegenüber der für Erwachsene gültigen Norm erhöht (4).

Nach neueren Untersuchungen an Normalpersonen (10; 11) ist die Fermentkonzentration in jungen Erythrozyten hoch und nimmt bei der Alterung der roten Blutzellen in vivo deutlich ab (5). Infolge ihres hohen Enzymgehaltes sind junge Erythrozyten relativ resistenter gegenüber dem Chinolinderivat Primaquin, Sulfonamiden, Plasmochin und ähnlich wirkenden Drogen als alte Erythrozyten (3). Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, daß der G-6-PD eine wichtige Rolle bei der Intakterhaltung der roten Blutzellen zukommt.

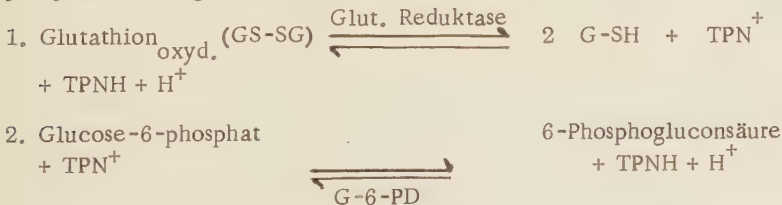
Klinik

Fehlt das Ferment, so kommt es zum Block im fermentativen Zuckerabbau, damit auch zum Block in der Bildung der Ribosephosphate und damit zu einer Störung des Nukleotidstoffwechsels. Die Verminderung der ATP und die Vermehrung des TPN-Gehaltes der Erythrozyten bei diesem Block sprechen für eine Ver-

minderung der Ribonukleotide. Dies führt über eine Störung des Cholesterin- und Fettsäureaufbaues in der Erythrozyten-Oberfläche zu einem defekten Aufbau derselben, und damit wird auch die Neigung dieser roten Blutzellen zur Hämolyse erklärbar (14). So entwickeln Menschen, denen die G-6-PD fehlt, (eine Hemmung oder Inaktivierung des Enzyms durch Autoantikörper konnte mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden) nach Genuß von Vicia faba (einer Bohnenart), als Reaktion auf das Antimalariamittel Primaquin oder infolge Einnahme von Sulfonamiden, Plasmochin oder p-Aminosalicylaten eine Gelbsucht mit hämolytischer Anämie (2; 3; 8; 13).

Der Mangel an G-6-PD ist eine Anomalie, die dominant vererbt wird. Der Defekt tritt familiär gehäuft auf (12) und ist anscheinend geschlechtsgebunden (3; 8; 12). Bei primaquin-empfindlichen männlichen Individuen war praktisch keine Fermentaktivität festzustellen, während primaquin-empfindliche weibliche Personen verschiedene Grade der Aktivitätsminderung zeigten (12). Bei afrikanischen und orientalischen Völkern tritt diese Anomalie anscheinend häufiger auf als bei der übrigen Erdbevölkerung. Die ersten zuverlässigen Berichte über diesen "Favismus" gehen auf die Zeit noch vor dem 5. Jahrhundert v. Chr. zurück. Wahrscheinlich war der Defekt damals im Mittelmeerbecken weit verbreitet (7). Im alten Ägypten war der Genuß von Bohnen verboten. Auch die Tatsache, daß die Pythagoräer sich dieser Nahrung enthielten, weist in dieselbe Richtung (6).

LÖHR und WALLER (8) fanden eine positive Korrelation zwischen der Menge des Enzyms in den Erythrozyten und der Stabilität des reduzierten Glutathions. Die Bildung von G-SH ist an die TPN-H₂ liefernden Reaktionen des Pentose-phosphat-Shunts gebunden (8):



Säuglinge unter 55 Std Alter zeigten eine starke Instabilität des G-SH trotz hoher G-6-PD-Aktivitäten.

Alle glykolytischen Fermente und die Hämoglobin-Reduktasen sind bei dieser Anomalie normal angelegt. Auch der ATP-Gehalt der Zellen ist normal. Als Folge des Fermentmangels sind AMP, ADP, TPN und DPN sowie die Gesamtpentosen deutlich erniedrigt. Theoretisch erwartete Störungen im Lipidstoff-

wechsel der Erythrozyten ließen sich nicht nachweisen. Der Kaliumgehalt der Erythrozyten war signifikant erniedrigt (8).

Erhöhte Konzentrationen der G-6-PD findet man bei perniziöser Anämie, Leberzirrhose und Coma hepaticum. Akute Hepatitis und Verschlaußikterus hingegen zeigen normale Werte (3; 8).

Die klinische Bedeutung der Bestimmung von G-6-PD besteht darin, daß es mit ihrer Hilfe möglich ist, die mit dem Fermentdefekt behafteten Individuen frühzeitig zu entdecken und sie vor den schädigenden Einflüssen zu schützen (3).

Bestimmung der GLUCOSE-6-PHOSPHAT-DEHYDROGENASE in Erythrozyten

GROSS, R. T., HURWITZ, R. E. und MARKS, P. A.: J. Clin. Invest. 37 (1958)
1176

Vorbereitung der Erythrozyten:

5 ml heparinisiertes venöses Blut wird 10 min lang bei 1500 x G zentrifugiert. Man entfernt Plasma und gelbbraune Schicht und wäscht die Erythrozyten zweimal in einer bei pH 7,4 gepufferten isotonischen Kaliumchloridlösung. Die roten Blutzellen werden in etwa dem doppelten Volumen (bezogen auf das Erythrozyten-Volumen) dieser Kaliumchloridlösung resuspendiert. Die Vorbereitung der Erythrozyten wird bei 0 Grad durchgeführt. Proben der resuspendierten Zellen werden durch zweimaliges Frieren und Auftauen hämolysiert. Mit dem so gewonnenen Hämolysat bestimmt man die Aktivität der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase nach KORNBERG und HORECKER (21).

Prinzip

Die Reduktion des Coenzym TPN ist begleitet von dem Auftreten einer Absorptionsbande mit einem Maximum bei 340 m μ , welche der oxydierten Form fehlt (23). In Anwesenheit von Substrat im Überschuß ist der Grad der Reduktion proportional der Menge des vorhandenen Enzyms.

Reagentien

1. Glucose-6-phosphat 0,02 m.

Man löst 522 mg des kristallinen Bariumsalzes

$(C_6H_{11}O_9)PbBa \cdot 7 H_2O$ (25 in 25 ml einer 0,02 m Essigsäure und gibt

2,0 ml 0,57 m K_2SO_4 hinzu. Das ausgefällte Bariumsulfat wird durch Zentrifugieren entfernt. Man neutralisiert die überstehende Lösung mit 0,2 m KOH und verdünnt auf 42,5 ml. Etwa 15 % des Esters werden von der Bariumsulfatfällung adsorbiert.

2. TPN ($1,5 \times 10^{-3}$ m).

13 mg der freien Säure (22) (Reinheitsgrad 85 %) werden in 10 ml Wasser gelöst.

3. $MgCl_2$, 0,1 m.

4. Glycylglycin-Puffer, 0,04 m, pH 7,5.

5. Ferment.

Man verdünnt die Vorratslösung an Enzym in kaltem Wasser, um 0,2 bis 0,8 Einheiten / ml (Definition siehe unten) zu erhalten.

Ausführung

Zu 1,0 ml Wasser in einer Quarzküvette oder einer solchen aus optischem Spezialglas mit einer Schichtdicke von 1 cm gibt man: 0,1 ml TPN, 0,25 ml Puffer und 0,2 ml $MgCl_2$. Bei 340 ~~mμ~~ wird in Abständen von 1 min unmittelbar nach Zugabe von 0,05 ml Ferment abgelesen.

Berechnung

Eine Enzymeinheit wird definiert als diejenige Menge Ferment, welche unter den angegebenen Bedingungen eine initiale Änderung der optischen Dichte von 1000 pro min (Zimmertemperatur 23 bis 25 Grad C) pro g Hämoglobin oder pro 10^6 Erythrozyten oder pro ml Erythrozyten-Niederschlag bewirkt (9; 21).

Die spezifische Aktivität wird in Einheiten pro mg Protein ausgedrückt. Das Eiweiß wird mit der turbidimetrischen Methode von BÜCHER (20) bestimmt, und mit einer Lösung von kristallinem Serum-Albumin standardisiert.

Modifikation der G-6-PD-Bestimmung nach MARKS (9)

Ansatz:

1. $MgCl_2$, 0,1 m (0,5 ml).

2. Glycylglycin-Puffer, 0,25 m, pH 7,6 (0,5 ml).

3. $2,3 \times 10^{-3}$ m TPN (0,1 ml).

4. Glucose-6-phosphat, 0,5 m (0,5 ml).

Hämolsat und Wasser werden auf 2,5 ml aufgefüllt.

Normalwerte (9):

15,9 $\pm$ 2,4/g Hämoglobin
0,54 $\pm$ 0,12 / 10⁶ Erythrozyten
4,95 $\pm$ 0,65 / ml Erythrozyten

Literatur

- 1) Abderhalden, R.: Klinische Enzymologie, p.161 G. Thieme Verlag (1958)
- 2) Beutler, E. et al.: zitiert bei 1)
- 3) Gross, R. T. et al.: J. Clin. Invest. 37 (1958) 1176
- 4) Gross, R. T. und Hurwitz, R.E. (1957): zitiert bei 3)
- 5) Gross, R. T. und Marks, P.A. (unveröffentlicht): zitiert bei 3)
- 6) Herodot: The Persian Wars: zitiert bei 12)
- 7) Luisada, A.: Favism. (Medecine, Baltimore) 20 (1941) 229
zitiert bei 12)
- 8) Löhr, G. W. und Waller, H.D.: Klin. Wschr. (1958) 865
- 9) Marks, P.A.: Science 127 (1958) 1338
- 10) Marks, P.A. (1957): zitiert bei 3)
- 11) Marks, P.A. et al. (im Druck): zitiert bei 3)
- 12) Szeinberg, A. und Sheba, C.: Israel Med.J. 17 (1958) 158
- 13) Szeinberg, A. et al. (1957): zitiert bei 3)
- 14) Waller, H.D. et al.: Klin. Wschr. (1957) 1022

Bestimmung

- 20) Bücher, T.: Biochem. Biophys. Acta 1 (1947) 292
- 21) Kornberg, A. und Horecker, B.L.: in Methods in Enzymology, Vol. I,
p. 323, New York 1955
- 22) Kornberg, A. und Horecker, B.L.: Biochem. Preparations 3 (1953) 24
- 23) Warburg, O. und Christian, W.: Biochem. Z. 287 (1936) 291
- 24) Warburg, O. und Mitarbeiter: Biochem. Z. 282 (1935) 157
- 25) Wood, W.A. und Horecker, B.L.: Biochem. Preparations 3 (1953) 71

β - GLUKURONIDASE

Das Enzym spaltet aus 4, 4-beta-Glukuroniden Glukuronsäure ab; so hydrolysiert es unter anderem gewisse Ausscheidungsprodukte von Hormonen wie Pregnandiol-Glukuronsäure, Oestradiol-Glukuronsäure, die Corticosteroid-Glukuronide und Noradrenalin-Glukuronsäure (1). Die β-Glukuronidase hat also eine bedeutsame Funktion bei der Entgiftung sowohl von körpereigenen als auch körperfremden Verbindungen wie Phenolen, Borneol, Menthol u. a. (1).

Das Ferment kommt in fast allen bisher untersuchten tierischen Geweben vor. Den höchsten Gehalt haben nach dem Endometrium die Leukozyten (1000 - 2800 Fishman-Einheiten pro g). Im Blutserum sind pro ccm beim Mann 162 (45 - 319), bei der geschlechtsreifen Frau 151 (42 - 316) und bei der in der Menopause befindlichen Frau 213 (127 - 278) Einheiten vorhanden (1).

Erythrozyten und Thrombozyten enthalten praktisch keine β-Glukuronidase (2). Das Enzym wird mit dem Harn ausgeschieden (1).

Das pH-Optimum der tierischen β-Glukuronidase liegt, in Abhängigkeit vom jeweiligen Substrat, zwischen 4, 5 und 5, 0 (1). Das Ferment wird durch Saccharo-1, 4-lakton, durch Schwermetalle und in geringerem Umfange durch Glukuronsäure gehemmt. Inhibitoren scheinen auch im Blutserum und in den Geweben vorhanden zu sein. Desoxyribonukleinsäure, Albumin und Protamin bewirken eine Aktivierung.

In Lösung ist das Ferment bei Aufbewahrung in der Kälte relativ stabil. Die reinsten Präparate, die man bisher erhalten hat, enthalten pro mg Protein etwa 32000 Fishman-Einheiten (1).

Die β-Glukuronidase ist eng mit dem Oestrogenstoffwechsel verbunden. Kastration senkt den Fermentgehalt des Uterus und des Brustdrüsengewebes im Tierversuch um etwa die Hälfte. Durch Zufuhr von Oestrogenen kann man die Fermentmenge wieder normalisieren.

Beim Menschen ist während der Schwangerschaft der Enzymgehalt des Blutes erhöht, besonders im letzten Drittel. Nach der Entbindung sinkt er innerhalb weniger Tage wieder zur Norm ab. Erhalten die Frauen jedoch nach der Geburt Oestrogene, so kommt es nur zu einer geringfügigen Abnahme der Fermentkonzentration.

Das Nabelschnurblut enthält weniger Ferment als das mütterliche venöse Blut. 10 Tage nach der Geburt ist jedoch der Enzymgehalt des kindlichen Blutes fast

doppelt so hoch wie der des mütterlichen. In der Amnionflüssigkeit ist mehr β -Glukuronidase enthalten als im Harn des Neugeborenen, aber weniger als im Blut der Mutter.

In der Mitte des Zyklus werden die niedrigsten Werte im Blut angetroffen (1).

Klinik

Die β -Glukuronidase ist klinisch in doppelter Hinsicht von Bedeutung: 1. zur Frühdiagnose präeklampsischer Zustände und 2. zur Diagnose von Genitalkarzinomen der Frau. Bei der Präeklampsie finden sich fast immer erhöhte Fermentwerte im Blut, und zwar bereits vor dem Auftreten präeklampsischer Symptome (4).

Bei Uterus- und speziell Cervixkarzinom enthält die Vaginalflüssigkeit von noch nicht in der Menopause befindlichen Frauen in 80 % der Fälle erhöhte Fermentwerte (3). Das Blut von Krebskranken enthält ebenfalls reichlich β -Glukuronidase (1).

In Leukozyten ist der Fermentgehalt bei chronisch lymphatischer Leukämie und chronisch myeloischer Leukämie deutlich herabgesetzt (gewöhnlich unter 1000 Einheiten pro g Leukozyten).

Akute lymphatische Leukämie und Monozytenleukämie zeigten normale Werte.

Die Lymphogranulomatose geht teils mit normalen, teils mit gesteigerten Fermentmengen einher.

Stark erhöhte Werte finden sich auch bei der akuten myeloischen Leukämie und bei der chronischen myeloischen Leukämie im Endstadium, wo man Werte bis zu 9000 und mehr Einheiten antreffen kann.

Infolge Zerfalls der Leukozyten ist der Fermentgehalt in der Synovialflüssigkeit bei entzündlichen Gelenkerkrankungen und in der Pleuraflüssigkeit Tuberkulöser ebenfalls hoch (1).

Bestimmung der β -GLUKURONIDASE im Blut

FISHMAN, W.H., SPRINGER, B. und BRUNETTI, R.:
J. Biol. Chem. 173 (1948) 449

Prinzip

Man bringt Phenolphthalein-Glukuronid mit der Enzymlösung zusammen. Das Enzym hydrolysiert das Substrat und setzt dabei Phenolphthalein in Freiheit, welches colorimetrisch bestimmt wird.

Herstellung des Substrates (Phenolphthalein-Glukuronid):

- a) Man benötigt hierzu Natrium-Phenolphthalein-Phosphat, das folgendermaßen gewonnen wird:

Trockenes Chloroform (40 ccm), dazu eine Mischung aus redestilliertem Phosphor-Oxychlorid (50 ccm) und Chloroform (50 ccm) werden unter mechanischem Rühren zu 50 g Phenolphthalein in einen im Eisbad gekühlten 1 Liter-Rundkolben gegeben. Man fügt tropfenweise trockenes Pyridin (40 ccm) hinzu und rührt 3 - 5 Std lang weiter.

Am nächsten Tag gibt man 150 ccm Aqua dest. in kleinen Mengen in das eisgekühlte Reaktionsgefäß, dazu etwa 300 ccm 40 %ige NaOH im Überschuß. Beim Abkühlen bilden sich nadelförmige Kristalle (Na-Phosphat), die man durch Filtrieren entfernt.

Versetzt man nun die wässrige Phase mit konz. HCl im Überschuß, so fällt Phenolphthalein-Diphosphorsäure aus als gummiartiger Niederschlag, den man durch Rühren mit einem Glasstab von der Mischung abtrennen kann. Dieser gummiartige Niederschlag wird in einer Porzellanschale über kochendem Wasserbad erhitzt. Unter ständigem Rühren gibt man nach und nach 20 ccm konz. NaOH (100 g NaOH + 100 ccm Aq. dest.) hinzu und füllt mit Aq. dest. bis zu einem Endvolumen von 200 ccm auf.

- b) Herstellung des Glukuronids auf biologischem Wege:

3 ccm dieses Phenolphthalein-Phosphats, mit schwachem Alkali neutralisiert und mit Aq. dest. auf 10 ccm verdünnt, werden pro Kaninchen täglich an zwei weit voneinander entfernten Stellen subkutan 6 Tage lang injiziert. Die Tiere erhalten Mohrrüben und Kohl, jedoch kein Wasser. Die Sammlung des Urins unter Toluol ist am Morgen des 8. Tages beendet. Der gefilterte toluolfreie Kaninchen-Urin wird durch kräftiges Schütteln mit 6-n HCl kongosauer gemacht. Danach extrahiert man den Urin in Portionen von je 800 ccm viermal mit je 125 ccm Aethylacetat. Man zentrifugiert die Aethylacetat-Phase, trocknet sie, indem man sie durch Watte abgießt, und engt sie bei 50 Grad C im Vacuum auf ein geringes Volumen ein. Dieses versetzt man mit in Aethylacetat im Überschuß gelöstem gesättigtem Cinchonidin. Das so gewonnene Cinchonidin-Derivat des Phenolphthalein-Glukuronids wird kristallin dargestellt durch Auflösen in einer

sehr geringen Menge heißen Methylalkohols und Zugabe des vierfachen Volumens an heißem Aethylacetat.

Um ein reines Phenolphthalein-mono- β -Glukuronid mit 1 Molekül Methylalkohol zu erhalten, ist eine weitere Kristallisation notwendig.

Reagentien

1. 0,1 m Acetatpuffer, eingestellt auf pH 4,5
2. 0,01 m Phenolphthalein-Glukuronid
3. Trichloressigsäure, 5 %
4. Trichloressigsäure, 10 %
5. Alkalische Mischung: 200 ccm Glycinpuffer, eingestellt auf pH 10,45 (5)
+ a) 50 ccm 0,5-n NaOH, falls die Proben mit 5 %iger Trichloressigsäure enteiweißt wurden, oder b) 50 ccm 1,0-n Alkali, bei Verwendung von 10 %iger Trichloressigsäure.

Ausführung

Plasma und geformte Elemente von Oxalat- oder Heparinblut (14 ccm auf zwei Wassermann-Gläser verteilt) werden durch Zentrifugieren getrennt. Nach Entfernung des Plasmas wird die Leukozytenschicht mit einer kapillaren Pipette aufgesaugt und mit 10 ccm Aqua dest. hämolysiert (nach abwechselndem Frieren in Kohlensäureschnee-Aceton-Mischung und Auftauen bei Zimmertemperatur, um die Auflösung zu erleichtern). Die Erythrozyten bringt man mit dem dreifachen Volumen Wasser zum Hämolysieren und bestimmt das Gesamtvolumen. Das Plasma wird vor Gebrauch durch ein Seitz-Filter gefiltert. Blutserum wird ohne jede vorhergehende Behandlung verwendet.

In 2 Wassermann-Gläser werden 0,1 ccm glukuronidasehaltige Lösung pipettiert sowie 0,8 ccm 0,1 m Acetatpuffer (5) und 0,1 ccm des 0,01 m Phenolphthalein-Glukuronids (5). Ein drittes Wassermannglas mit Enzym und Puffer, jedoch ohne Substrat, dient als Kontrolle. Die Ansätze werden dann bei 38 Grad C inkubiert und die Zeit wird registriert.

Für Blutplasma, Serum und Zellen ist eine Inkubationsdauer zwischen 15 und 24 Std notwendig. Am Ende der Inkubationszeit gibt man 1,0 ccm 5 %ige Trichloressigsäure in jedes Glas und mischt den Inhalt gründlich durch. Zu Proben aus hämolysierten Zellen wird 1,0 ccm 10 %iger Trichloressigsäure gegeben, um die Reaktion zum Stillstand zu bringen und die Mischung zu enteiweißen. Man registriert die Zeit. Die Gläser werden sodann bei hoher Geschwindigkeit 10 min lang zentrifugiert. Ihr Inhalt wird durch Wattebäusche in

Gläser abgegossen, die bei 6 ccm graduiert sind. Diese Colorimeter-Gläser oder -Küvetten enthalten 2,5 ccm alkalischer Mischung (s.o.). Der nach dem Abgießen zurückbleibende Niederschlag wird in 1,0 ccm Aqua dest. suspendiert, zentrifugiert und der Überstand durch denselben Filter abgegossen. Glas und Trichter werden weiter gewaschen, bis ein Endvolumen von 6 ccm erreicht ist.

0,1 ccm des 0,01 m Phenolphthalein-Glukuronids wird in die Leerwert-Küvette pipettiert. Nach gründlichem Durchmischen werden die Proben mit dem 540 m μ -Filter abgelesen. Man ermittelt die Werte für die optische Dichte (L) durch Zusatz bekannter Phenolphthaleinmengen zu der gesamten Testmischung.

Werden frische Reagentien verwendet, so ist es wichtig, das pH der Mischung nach Alkalizusatz (pH 10,2 bis 10,4) oder die Farbentwicklung einer bekannten Menge Phenolphthalein zu prüfen.

1. Berechnung für Serum, Plasma oder Körperflüssigkeiten:

$$\frac{\text{Phenolphthalein gebildet nach Inkubation}}{\text{Inkubationszeit in Std}} \cdot \frac{1}{\text{ccm analysierte Flüssigkeit}} \cdot 100$$

= Einheiten Glukuronidase pro 100 ccm Flüssigkeit

2. Berechnung für hämolysierte Blutzellen:

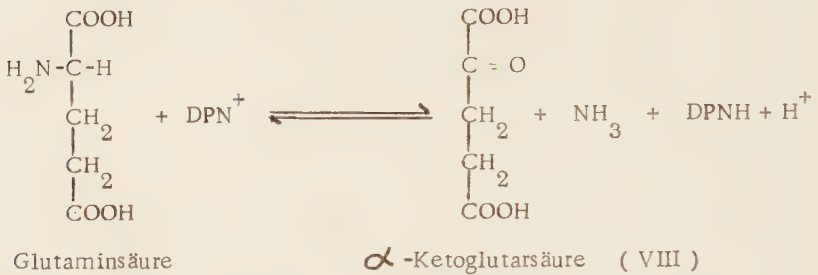
$$\frac{\text{Phenolphthalein gebildet nach Inkubation}}{\text{Inkubationszeit in Std}} \cdot \frac{1}{\text{Volumen hämolysierter Zellen}} \cdot \frac{100}{\text{Volumen der Ausgangs-Blutmenge}}$$

= Einheiten Glukuronidase pro 100 ccm Vollblut.

Literatur

- 1) Abderhalden, R.: Klinische Enzymologie, p.104 ff., G.Thieme Verlag
(1958)
- 2) Fishman, W.H. et al.: J. Biol. Chem. 173 (1948) 449
- 3) Homburger, F. und Fishman, W.H.: zitiert bei 1)
- 4) Odell, L.D. und McDonald, D.F.: zitiert bei 1)

GLUTAMINSÄURE-DEHYDROGENASE



Indem das Enzym die Umwandlung von Glutaminsäure und α -Ketoglutar säure ineinander katalysiert, spielt es eine wichtige Rolle im intermediären Stoffwechsel, speziell bei der Transaminierung und der Übertragung von NH_2 -Gruppen bei der Harnstoffbildung, sowie bei der Entgiftung des Ammoniaks im Gehirnstoffwechsel durch Bindung an Glutaminsäure (7).

Die Glutaminsäure-Dehydrogenase (GD) kommt in fast allen Geweben, besonders in Leber, Niere und Herzmuskel vor (1). Im Blutplasma fehlt sie; hingegen ist sie in den Leukozyten vorhanden und zwar sowohl in den Granulozyten als auch in den Lymphozyten (1; 9). Bildungsort des Enzyms sind anscheinend die Mitochondrien (3; 6). Die GD ist wie die Phosphatasen in den Leukozyten erst vom Stadium der jugendlichen Granulozyten an nachweisbar. Ein Teil der Fermentsysteme wird also erst im Zuge der Zellreifung gebildet (9).

Das pH-Optimum der GD liegt bei 7,6. Ihr Molekulargewicht beträgt etwa 1000 000 (8).

Die GD liegt vermutlich als polymere Proteinverbindung vor, bestehend aus vier Ferment-Untereinheiten. Dissoziation des Enzyms erreicht man durch Zugabe von DPNH (4).

Klinik

Bei Krebs und bei Leukämien war der GD-Gehalt der Leukozyten durchschnittlich um das Fünffache gesteigert (10). Jedoch hat die Bestimmung der GD in den Leukozyten wegen ihrer stark schwankenden Ergebnisse keine diagnostische Bedeutung.

Während die GD normalerweise im Blutserum fehlt, findet man sie hier bei

Leberkrankheiten (Hepatitis, Leberzirrhose) und bei der Erb'schen Muskeldystrophie in recht erheblichen Mengen (5). Auch Diabetes kann einen erhöhten GD-Spiegel im Serum bedingen (1).

Bestimmung der GLUTAMINSÄURE-DEHYDROGENASE in Leukozyten

REMY, D. und WIEDING, J.: Ärztl. Forsch. 11 (1957) 1/502

Prinzip

Die Fermentaktivität wird bestimmt, indem man das Enzym in Gegenwart von DPNH und Ammonium-Ionen auf α -Ketoglutar säure einwirken läßt. Die entsprechend Reaktionsgleichung (VIII) erfolgende Oxydation von DPNH kann in der üblichen Weise bei 366 m μ optisch verfolgt werden.

Die Aufarbeitung des zu testenden Materials (Leukozytensuspension) entspricht dem bei der Bestimmung der Milchsäure-Dehydrogenase beschriebenen Verfahren (s. S. 121). Auch hier werden die Zellen homogenisiert und dreimal gefroren.

Das folgende Verfahren ist ebenfalls für Extrakte aus anderen Zellen und Geweben geeignet.

Reagentien

1. Enzymatisch reduziertes Diphosphopyridin-Nukleotid (Boehringer) (64 %ig). 100 mg Substanz werden in 5 ml quarzdestilliertem Wasser gelöst. 0,03 bis 0,04 ml dieser Lösung weisen bei Verdünnung auf ein Gesamtvolumen von 3 ml und einer Schichtdicke von 1 cm gegenüber der Verdünnungsflüssigkeit eine Extinktionsabnahme von 1 optischen Einheit (E) auf. 1 E entspricht einem Δ E von 1,000. Nach den Untersuchungen von BÜCHER und Mitarbeitern (2) entspricht die im Ansatz vorhandene Menge von DPNH₂ 0,87 Mikromol. Nach mehrtägigem Stehen vermindert sich der Gehalt dieser Lösung an DPNH₂, so daß vor Beginn jedes Versuches das der optischen Einheit entsprechende Volumen ermittelt werden muß.
2. Zu dem vorstehend beschriebenen Ansatz gibt man zusätzlich 0,04 ml Ammoniumacetat.
3. α -Ketoglutar säure
wird mit 2-n NaOH auf pH 6,8 eingestellt und anschließend auf ein

geeignetes Volumen verdünnt, dessen Konzentration man mit Hilfe des enzymatischen Tests bestimmt. Pro Ansatz werden 27,9 μ Mole α -Ketoglutar säure eingesetzt.

4. Trilon (Äthylendiamin-tetraacetat)
in einer Endkonzentration von 2,0 mg/ml.
5. Zu testende Fermentlösung,
d. h. Plasma, Leukozytensuspension oder hämolysierte Erythrozyten
in einem Volumen von 0,02 bis 0,1 ml im Ansatz.
6. Triäthanolamin-HCl-Puffer (Trap), 0,2 m, pH 7,4.
Die Pufferlösung wird mit Ringerlösung im Verhältnis 1 : 19 verdünnt.

Ausführung

Die Lösungen 1 - 5 werden unter Berücksichtigung der angegebenen Molaritäten wie folgt in die Photometerküvette pipettiert:

0,03 ml DPN-H₂

0,06 ml Trilon

2,8 bis 2,9 ml Ringer-Trap, so daß das vorher zu errechnende Gesamtvolumen von 3 ml erreicht wird.

0,02 ml zu testende Fermentlösung (Leukozytensuspension, hämolysierte Erythrozyten oder Plasma).

0,03 ml α -Ketoglutaratlösung als Start.

Photometrie:

Standardbedingungen

Gesamtvolumen:	Σ V =	3,0 ml
Schichtdicke:	d =	10,0 mm
Wellenlänge:	λ =	366 μ
Temperatur:	T =	30 Grad C

Nach den Untersuchungen von BÜCHER und Mitarbeitern (2) ist die Messung bei 366 μ möglich, da auch hier Proportionalität zwischen Extinktionszunahme und Nukleotidreduktion im ganzen Meßbereich herrscht.

Die Messungen werden im Photometer "Eppendorf" durchgeführt, wobei die Temperatur durch einen Thermostaten mit Unwälpumpe und Abzweigung zu einer Durchströmungsküvette konstant gehalten wird (Thermomix-Gerät der Firma Braun, Melsungen).

Standardisierung

Die Extinktionsänderung $\Delta E \left(\frac{1}{1000 E} \right)$ /min/ml der Leukozytensuspension) gilt als Einheit der Fermentaktivität, bezogen auf 10^5 Zellen im Ansatz.

Die Normalwerte betragen im Mittel: $9,6 \pm 6,1 E$.

Literatur

- 1) Abderhalden, R.: Klinische Enzymologie p.122 ff., G. Thieme Verlag (1958)
- 2) Bücher, Th. et al.: zitiert bei 7)
- 3) Christie, G.S. und Judah, J.D. (1953): zitiert bei 7)
- 4) Frieden, C.: Biochem. Biophys. Acta 27 (1958) 431
- 5) Gerlach, U.: zitiert bei 1)
- 6) Greenbaum, A.C. et al. (1954): zitiert bei 7)
- 7) Lehnartz, E.: Einführung in die Chemische Physiologie, Springer Verlag (1952) p. 436
- 8) Olson, J.A. und Anfinsen: J. Biol. Chem. 197 (1952) 67
- 9) Remy, D. und Wieding, J.: Ärztl. Forschg. 11 (1957) I/502
- 10) Waisman, H.A. et al. (1956): Cancer Research 16 (1956) 344

GLUTATHION-REDUKTASE (TPNH - GSSG - REDUKTASE)



Die Aufgabe des Fermentes besteht darin, das durch das Cytochromsystem oxydierte Glutathion wieder in die reduzierte Form überzuführen, die möglicherweise von Bedeutung für die Aufrechterhaltung von Sulfhydryl-Enzymen im aktiven Zustand ist (1).

Die Glutathion-Reduktase (GR) findet sich im Serum, in den Erythrozyten und in verschiedenen Körperflüssigkeiten (Liquor, Ergüsse). Am höchsten ist die Konzentration der GR jedoch im Homogenat menschlicher Leber, Nieren und Pankreas. Normale menschliche Erythrozyten haben eine 2-3mal so hohe Aktivität wie das entsprechende Plasma. Es war kein Einfluß von Geschlecht, Alter, Hautfarbe oder Hungerzustand auf die Aktivität des Enzyms festzustellen (3).

Seren, die eine Woche lang bei -10 Grad C oder im Kühlschrank bei 4 Grad C gehalten wurden, zeigten keine signifikante Abnahme der GR-Aktivität.

Erhitzen der Seren auf 56 Grad C für die Dauer von 5 min hat eine Abnahme der Enzymaktivität um etwa 50 % zur Folge. Weiteres Erhitzen setzt die Aktivität noch mehr herab. Zwischen pH 8,1 und 7,3 wurde keine signifikante Änderung der GR-Aktivität beobachtet. Außerhalb dieser Werte ließ sich jedoch eine deutliche Abnahme der Aktivität feststellen. Die optimale Phosphatpuffer-Konzentration für die Enzymreaktion ist 0,15 m.

Die GR des menschlichen Serums unterscheidet sich dadurch scharf von GR anderer Herkunft, daß ihr pH-Optimum im schwachsauren Bereich liegt (2).

Die mittlere GR-Aktivität normaler menschlicher Seren beträgt 40 ± 15 Einheiten/ml (3).

Klinik

Bei unbehandelter Perniciosa und akutem Anfall von Porphyrie (je ein Patient) wurde eine vermehrte GR-Aktivität beobachtet (2).

Erhöhte Werte für die Serum-GR fand man vor allem bei Patienten mit homologer Serum-Hepatitis, infektiöser Hepatitis und toxischer Hepatitis auf Grund von Salizylaten, sowie bei Coma hepaticum und Karzinomen in disseminiertem Stadium (3).

Patienten mit Lymphomen scheinen keine erhöhten GR-Werte zu haben (3).
Gesteigerte GR-Aktivität in der Pleura- oder Peritonealflüssigkeit geht nicht notwendigerweise auch mit erhöhten Werten im Serum einher (3).

Bestimmung der GLUTATHION-REDUKTASE im Serum

MANSO, C. und WROBLEWSKI, F.: J. Clin. Invest. 37 (1958) 214

Prinzip

Die parallel zum Übergang des oxydierten Glutathions in die reduzierte Form sich vollziehende Umwandlung von TPNH zu TPN^+ läßt sich nach WARBURG spectrophotometrisch verfolgen.

Reagentien

1. Oxydiertes Glutathion.

200 mg werden in Aqua dest. gelöst. Die Lösung wird jeden Tag frisch hergestellt.

2. TPNH.

20 mg werden in 3,0 ml Puffer gelöst und weiter mit Puffer verdünnt, um schließlich eine Lösung mit einer optischen Dichte zwischen 750 und 850 bei 340 m μ zu haben. Diese Lösung wird ebenfalls jeden Tag frisch bereitet.

3. Rinderserum-Albumin.

50 mg der GR-freien Substanz löst man in 10,0 ml Puffer.

4. Puffer: 0,15 m bei pH 7,6 : Kaliumphosphat oder "Tris"

(Trishydroxymethylaminomethan), letzteres mit HCl auf das gewünschte pH eingestellt.

Die Reagentien sind im Handel erhältlich.

Ausführung

Serum oder Plasma (mit Heparin oder Citrat) und heparinisiertes Vollblut werden durch Venenpunktion gewonnen, ohne Rücksicht auf den Nüchternzustand. Serum und Plasma werden durch 10 min langes Zentrifugieren (2000 U/min) bei Zimmertemperatur getrennt. Wo nicht anders erwähnt, werden alle Proben auf 4 Grad C binnen 3 Std nach der Blutentnahme abge-

kühlt und für die GR-Bestimmung innerhalb von drei Tagen nach Blutentnahme verwendet. Kontrollbestimmungen haben gezeigt, daß die Fermentaktivität während dieser Zeitspanne bei Zimmertemperatur nicht nennenswert wechselt.

Hämolysierte Erythrozyten werden zubereitet, indem man 0,1 ml heparinierter zentrifugierter Erythrozyten verwendet. Diese Menge wird mit 5,0 ml Aq. dest. verdünnt und 10 min lang bei 2000 U/min zentrifugiert, um Zelltrümmer zu entfernen.

Spektrophotometrische Bestimmung der GR-Aktivität:

Zu 0,5 ml Serum oder Plasma gibt man 2,3 ml Phosphatpuffer und 0,1 ml TPNH. Die Mischung wird bei Zimmertemperatur (26 Grad C) 20 min lang inkubiert. Dann gibt man 0,1 ml GSSG hinzu. Der Ablauf der Reaktion wird in einem Spektrophotometer (Modell U Beckman) mit einer Schichtdicke von 1 cm verfolgt. In Abständen von 15 oder 30 sec liest man 5mal nacheinander die Änderung der optischen Dichte ab. Aus der durchschnittlichen Abnahme der optischen Dichte während der 15- oder 30 sec-Intervalle wird die Änderung der optischen Dichte pro min pro ml Serum oder Plasma berechnet.

Standardisierung

Eine Einheit der GR-Aktivität wird definiert als eine Änderung der optischen Dichte von 0,001 pro ml pro min bei 340 m μ .

Dasselbe Verfahren wird zur Messung der GR-Aktivität der hämolysierten Erythrozyten benutzt, abgesehen davon, daß man 0,2 ml Rinder-Albumin zu der Inkubations-Mischung hinzugibt und die Menge des Phosphatpuffers auf 2,1 ml reduziert (4).

Bestimmung der GLUTATHION-REDUKTASE (DPNH-GSSG-Reduktase) im Serum

HORN, H.D. und BRUNS, F.H.: Biochem. Z. 331 (1958) 58

Für die GR-Aktivität ist nicht nur TPNH, sondern auch DPNH als Wasserstoffdonator wirksam.

1. Ansatz für den optischen Test der TPNH-abhängigen Reaktion:

- 1,6 - 2,4 ml Phosphatpuffer nach SÖRENSEN, 0,067 m (pH 6,5);
- 0,02 ml TPNH-Lösung;
- 0,02 ml GSSG-Lösung;
- 0,2 - 0,8 ml Serum.

Gesamtvolumen: 3,0 ml.

TPNH-Konzentration: 0,4 M/ml Testansatz;

Endkonzentration von GSSG: $5 \cdot 10^{-4}$ m.

Start durch Zugabe von Serum;

d = 1 cm, Wellenlänge: 366 m μ ; t = 25 Grad C.

Blindwert: Aqua dest. an Stelle von GSSG-Lösung.

Die Substratlösung wurde mit NaOH auf pH 6,3 - 6,4 eingestellt.

2. Ansatz für den optischen Test der DPNH-abhängigen Reaktion:

1,7 - 2,5 ml Phosphatpuffer 0,067 m (pH 6,2);

0,1 ml DPNH-Lösung;

0,2 ml GSSG-Lösung;

0,2 - 1,0 ml Serum.

Gesamtvolumen: 3,0 ml.

DPNH-Konzentration: 0,35 M/ml Testansatz;

Endkonzentration von GSSG: $5 \cdot 10^{-4}$ m.

Start durch Zugabe von Serum;

d = 1 cm. Wellenlänge 366 m μ ; t = 25 Grad C.

Blindwert: Aqua dest. an Stelle von GSSG-Lösung.

Optimale Reaktionsbedingungen:

Mit TPNH liegt das pH-Optimum bei 6,5;

$K_{TPNH} = 2,5 \cdot 10^{-5}$ Mol/l.

Mit DPNH liegt das pH-Optimum bei 6,2;

$K_{DPNH} = 5 \cdot 10^{-4}$ Mol/l.

Ab $5 \cdot 10^{-4}$ m GSSG ist die Reaktionsgeschwindigkeit sowohl mit TPNH als auch mit DPNH maximal.

Die Affinität von DPNH zum Enzym ist wesentlich geringer als diejenige von TPNH.

Der DPNH-katalysierte Prozeß wird durch Phosphat aktiviert. Diese Stimulierung fehlt bei Einsatz von TPNH als Coenzym. Stärkere Hemmung der GR durch Tris-Maleinat-Puffer in Anwesenheit von Phosphat und bei Einsatz von DPNH als Wasserstoffdonator. Verwendet man dagegen TPNH, so tritt diese Hemmung nicht auf. Phosphat allein hemmt die DPNH-Reaktion bei Konzentrationen oberhalb 0,05 m.

Auffällig ist eine starke Hemmung bes. der DPNH-abhängigen Reaktion durch

Heparin. Diese Hemmung ist eine Funktion der Heparin-Konzentration, stark pH-abhängig und nur beim pH-Optimum und auf dem sauren Schenkel der pH-Aktivitätskurve sichtbar.

Standardisierung

Als Enzymaktivität wird die je ml Serum und Std reduzierte Menge GSSG in μM angegeben.

(DPNH, TPNH und GSSG waren käufliche Präparate der Fa. Boehringer und Söhne. Meßinstrumente: Photometer "Eppendorf" sowie pH-Meßgeräte der Methrohm-AG, Herisau/Schweiz.)

Normalwerte (Mittelwerte): je ml Serum und Std

GSSG-Umsatz von 0,76 μM mit TPNH
0,42 μM mit DPNH

Literatur

- 1) Conn, E.E. und Vennesland, B.: J. Biol. Chem. 192 (1951) 17
- 2) Horn, H.D. und Bruns, F.H.: Biochem. Z. 331 (1958) 58
- 3) Manso, C. und Wroblewski, F.: J. Clin. Invest. 37 (1958) 214
- 4) Racker, E.: J. Biol. Chem. 217 (1955) 855

HYALURONIDASE

Das als Hyaluronidase bezeichnete Ferment stellt wahrscheinlich einen Komplex von mindestens zwei Enzymen dar (1).

Das Ferment, dessen Reindarstellung noch nicht gelungen ist, hat wohl im wesentlichen die Aufgabe, durch den Auf- und Abbau der Mucopolysaccharide die Permeabilität und das Wasserbindungsvermögen der Gewebe zu steuern (1). Hyaluronsäure ist ja neben der Chondroitinsäure der Hauptbestandteil der Grundsubstanz der Binde- und Stützgewebe des Körpers sowie der Interzellularsubstanz. Bei Einwirkung der Hyaluronidase auf Hyaluronsäure entstehen Glukuronsäure und Acetylglukosamin. Das Enzym vermag jedoch nur solche Mucine zu hydrolysieren, bei denen die Carboxylgruppe der Hyaluronsäure salzartig von Proteinen gebunden ist (1).

Das Molekulargewicht der Hyaluronidase wird auf 200 000 bis 500 000 geschätzt. Das pH-Optimum liegt je nach der Herkunft des Fermentes zwischen 4,6 und 7,0 (1).

Kochsalz bewirkt eine Aktivitätssteigerung des Enzyms, ebenso Protamin.

Hemmend wirken hingegen Heparin, Salicylsäure und ihre Derivate, Jod, Formaldehyd, Phenole und Hesperidinphosphat (1). Alle Blutseren hemmen die Hyaluronidase-Aktivität. Die geringste spezifische Inhibition zeigen die Seren gesunder Männer. Bei gesunden Frauen ist die Fermenthemmung größer, aber nicht abhängig vom Zyklus. Eine starke Hemmwirkung findet sich vor allem am Ende der Gravidität, was als Adaptationsvorgang angesichts der stärkeren Belastung des Organismus gedeutet wird. Es gibt außerdem einen thermolabilen unspezifischen Inhibitor, der elektrophoretisch mit der Albuminfraktion wandert und ein Glied des allgemeinen Abwehrmechanismus ist (6).

Klinik

In Zunahme begriffene Oedeme, meist cardialer Genese, gehen mit erniedrigten Hyaluronidasewerten einher. Hingegen ergeben sich während der Oedem-Ausschwemmung meist normale Werte.

Stress hat eine Verminderung der Hyaluronidase-Aktivität zur Folge. Diese vermehrte Hemmung (Anstieg des Inhibitorspiegels) bleibt bei Ratten nach Adrenalectomie aus, was auf einen Einfluß der Nebenniere auf die unspezifischen Inhibitoren hindeutet (6).

Leberzirrhosen mit manifesten Wasserhaushaltsstörungen zeigten zum Teil stark erniedrigte Hyaluronidase-Werte.

Bei fieberhaften und entzündlichen Erkrankungen ist die Fermentaktivität meist erniedrigt, und zwar um so mehr, je schwerer das klinische Bild ist. Die Werte stiegen mit Besserung des Allgemeinbefindens wieder an (3).

Akute rheumatische Prozesse waren von verminderten Ferment-Aktivitäten begleitet; bei chronischen waren die Werte dagegen normal (2).

Bei rheumatischer Endomyokarditis stellte man eine meist vermehrte Fermentaktivität im Blute fest (5).

Eine sichere Beziehung zwischen dem Bluteiweißbild und der Hyaluronidase-Aktivität des Serums ist nicht erkennbar, auch nicht bei rheumatischen Affektionen und akuten Infekten (3).

Schwere Nephritis hatte erniedrigte Werte zur Folge; bei leichter Nephritis war keine Abweichung vom Normalwert festzustellen (3).

Bei Tumoren und Leukämien war die Enzymaktivität vermindert, besonders bei fortgeschrittenen Tumoren. Die Aktivitätsminderung entspricht im allgemeinen der Malignität bzw. der Ausdehnung des Tumors.

Myelosen und -Plasmocytome zeigten keine nennenswerten Abweichungen von der Norm (3).

Die Erniedrigung der Aktivität bei den oben genannten Krankheiten beruht wahrscheinlich auf einer gesteigerten Wirksamkeit des unspezifischen thermostabilen Inhibitors im Serum (4; 6).

Bestimmung der HYALURONIDASE im Serum

van REY, W. und FINCKH, R.: Klin. Wschr. (1957) 540
(Modifikation der Methode von GIBIAN (10; 11))

Prinzip

Man bestimmt die Zeit, nach der die Viskosität des Substrat-Fermentansatzes bis auf den Mittelwert zwischen Substrat und Lösungsmittel abgesunken ist. Diese Zeit ist der Fermentaktivität umgekehrt proportional.

Reagentien

1. Substrat:

Die Hyaluronsäure gewinnt man nach dem Verfahren von WATTENBERG und GLICK (12) aus menschlichem Nabelschnurpulver durch Extraktion mit verdünnter Hayem'scher Lösung. Durch Fällung mit Aceton erhält man eine erste in Fäden und eine zweite als feines Präzipitat ausfallende Fraktion. Beide Fraktionen werden getrennt mit Alkohol und Äther gewaschen, pulverisiert und über Phosphorpentoxyd getrocknet. Das erhaltene feine weiße Pulver ist unbeschränkt haltbar. Auf das getrocknete Nabelschnurpulver bezogen, beträgt die Ausbeute etwa 4 % in der ersten (0,51 % N) und 3 % in der zweiten Fraktion (1,7 % N). Beide Fraktionen lassen sich in Aqua dest. oder Pufferlösung ohne Rückstand auflösen und ergeben eine leicht opale visköse Flüssigkeit. Für die Versuche wird Hyaluronsäurepulver der ersten Fraktion (etwa 0,6 %) gelöst und zentrifugiert. Durch weiteres Verdünnen wird die Konzentration so eingestellt, daß die relative Viskosität im Versuchsansatz (0,5 ccm Substrat + 0,2 ccm Lösungsmittel) 2,0 - 2,2 beträgt. Man kann die Hyaluronsäurelösung noch durch eine Glasfritte filtrieren und auf diese Weise wasserklar machen. Das Substrat wird alle 8 - 10 Tage frisch angesetzt und in der Zwischenzeit im Kühlschrank aufbewahrt. Hitzesterilisierung ist möglich, aber nicht notwendig.

2. Lösungsmittel:

Steriler Standardacetatpuffer pH 4,62 "Merck" + 3 % NaCl + 2 mg % Chloramphenicol (Paraxin "Boehringer").

3. Vergleichsstandard:

Stiertestis-Hyaluronidase (Kinetin "Schering") in Lösung 2)

Verdünnungsreihe 0,1; 0,05; 0,025; 0,01; 0,005 E/ccm (a - e).

Der Vergleichsstandard wird für jede Versuchsreihe frisch angesetzt.

Die eingefrorenen oder im Kühlschrank aufgehobenen Ferment-Standardlösungen verlieren jedoch nicht wesentlich an Wirksamkeit.

4. Serum.

Steril entnommenes Venenblut wird etwa 2 Std bei 5 Grad C aufbewahrt und zentrifugiert, ein Teil wird durch Wärme (57 Grad C, 30 min) inaktiviert (Si), der andere Teil unbehandelt gelassen (Sn). Die Verarbeitung der Seren soll innerhalb von 4 Std nach der Blutentnahme erfolgen. Mehrtägige Aufbewahrung im Kühlschrank oder in eingefrorenem Zustande führte zu einem merkbaren, aber ungleichmäßigen Aktivitätsverlust.

5. Ansätze (jeweils doppelt).

a) Allgemeiner Standard:

0,5 ccm Lösung 1) + 0,1 ccm Lösung 2) + 0,1 ccm Lösung 3)
a - e bzw. Lösung 2).

b) Spezieller Standard (für jedes Serum):

0,5 ccm Lösung 1) + 0,1 ccm Si + 0,1 ccm Lösung 3) a - e bzw.
Lösung 2)

c) Ansatz mit Nativserum:

0,5 ccm Lösung 1) + 0,1 ccm Sn + 0,1 ccm Lösung 2)

Ausführung

Nach gründlicher Durchmischung in hitzesterilisierten, luftdicht verschlossenen Reagenzgläsern werden die Ansätze 20 Std lang bei 37 Grad C inkubiert. Man mißt die Viskosität nach Temperaturangleichung und bei gleichbleibender Raumtemperatur mit einer (evtl. selbstgefertigten) Auslaufpipette (Vol. 0,5 ccm, Ausflußzeit für Aqua dest. 10 sec) und einer Stoppuhr. Aus 5 Messungen errechnet man jeweils den Mittelwert. Zu Beginn der Messungen und zwischen den einzelnen Ansätzen wird die Pipette gründlich mit Lösungsmittel ausgespült und dabei die Konstanz der Ausflußzeit kontrolliert.

Berechnung

Aus den Ausflußzeiten des Lösungsmittels und der einzelnen Ansätze errechnet man die spezifische Viskosität und bestimmt ihre prozentuale Abnahme unter Einwirkung des Nativserums bzw. des Vergleichsstandards.

Die Berechnung erfolgt nach folgenden Formeln:

1. Relative Viskosität:

$$\eta_{\text{rel.}} = \frac{t_H}{t_O} \qquad \eta'_{\text{rel.}} = \frac{t'_H}{t_O}$$

2. Spezifische Viskosität:

$$\eta_{\text{spez}} = \frac{t_H - t_O}{t_O} = \eta_{\text{rel.}} - 1$$

$$\eta'_{\text{spez}} = \frac{t_{H'} - t_O}{t_O} = \eta'_{\text{rel.}} - 1$$

3. Prozentuale Abnahme von $\eta_{\text{spez.}}$ durch Fermenteinwirkung:

$$A = \frac{\eta_{\text{spez}} - \eta'_{\text{spez}}}{\eta_{\text{spez}}} \cdot 100 = \frac{t_H - t_{H'}}{t_H - t_O} \cdot 100$$

t = Ausflußzeit

O = Lösungsmittel

H = Hyaluronsäurelösung

H' = teilweise fermentativ abgebaute Hyaluronsäure

Für die Standardansätze gilt als t_H die Ausflußzeit ohne Fermentzusatz und als $t_{H'}$ diejenige mit Zusatz der jeweiligen Fermentverdünnung. Bei den Serumansätzen werden sinngemäß als t_H die Ausflußzeit der Ansätze mit Zusatz von inaktiviertem und als $t_{H'}$ die Ausflußzeit der Ansätze mit Zusatz von Nativserum eingesetzt.

Die zum Werte A des Serumansatzes gehörige Fermentkonzentration (in Kinetin-Einheiten) wird sowohl auf der Kurve des allgemeinen Standards als auch auf der des speziellen Standards abgelesen.

Als Normalwerte gelten für beide Bestimmungsmethoden

a) bei Verwendung unfiltrierten Substrates: $35,0 - 50,0 \cdot 10^{-3}$ E / ccm;

b) bei Messung mit filtriertem Substrat: $45,0 - 60,0 \cdot 10^{-3}$ Kinetin-Einheiten/ccm.

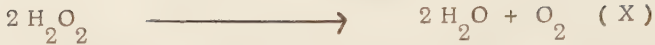
Literatur

- 1) Abderhalden, R.: Klinische Enzymologie, p. 202 ff., G. Thieme Verlag (1958)
- 2) Hartmann, F. und Matijevic, G.: zitiert bei 3)
- 3) Rey, W. van und Finckh, R.: Klin. Wschr. (1957) 540
- 4) Literatur bei 3)
- 5) Stepanjan, E. P. und Pertschikova, G. E.: zitiert von Fölsch: Dtsch. Med. Wschr. (1958) 938
- 6) Vasterling, H. W.: Klin. Wschr. (1958) 489

Bestimmung

- 10) Gibian, H.: Hoppe-Seylers Z. 289 (1951) 1
- 11) Gibian, H.: Hoppe-Seylers Z. 289 (1952) 165
- 12) Wattenberg, L. W. und Glick, D.: J. Biol. Chem. 179 (1949) 1213

KATALASE



Das Enzym katalysiert die Spaltung von H_2O_2 in molekularen Sauerstoff und Wasser. Fehlt die Katalase, so kommt es zu einer Schädigung des Gewebes, da H_2O_2 als starkes Zellgift wirkt.

Die Katalase findet sich in allen Geweben und Flüssigkeiten des menschlichen Organismus. Reichlich ist das Enzym in den Erythrozyten, sowie in Lymphozyten und Leukozyten enthalten. Im Plasma ist nur wenig Katalase nachweisbar (1; 6; 8).

Katalase ist ein eisenhaltiges Protein (4) mit einem Molekulargewicht von etwa 25 000 (1). Es wird durch Trypsin inaktiviert (10). Der isoelektrische Punkt des Enzyms liegt zwischen pH 5,4 und 5,7 (1).

Das Coferment der Katalase ist identisch mit dem Protohäm in IX (1).

Inhibitoren sind vor allem solche Stoffe, die mit dem Eisen der prosthetischen Gruppe reagieren, wie Cyanide, Sulfide, Azide, Fluoride und Hydroxylamin (1). Auch das Substrat der Katalase, das Wasserstoffsuperoxyd, übt eine hemmende Wirkung aus (1).

Der Katalasegehalt des Blutes pflegt bei ein und demselben Individuum ziemlich konstant zu sein. Alters- und Geschlechtsunterschiede bestehen praktisch nicht. Hunger und Nahrungsaufnahme haben keinen Einfluß auf die Blutkatalase, ebensowenig die Jahreszeiten (1). Die Retikulozyten im peripheren Blut besitzen eine höhere Aktivität als die reifen Erythrozyten. Der Fermentgehalt sinkt mit dem Älterwerden der Zelle kontinuierlich ab (3).

Klinik

Akatalasämie

TAKAHARA und MIYAMOTO beschrieben als erste das angeborene Fehlen von Katalase im Blut. Das Leiden tritt familiär gehäuft auf. Stets waren die Eltern nahe miteinander verwandt. Das Leiden, das wahrscheinlich erblich ist, äußert sich klinisch im Auftreten nekrotisierender Geschwüre in der Mundhöhle. Erst nach Entfernung der erkrankten Zähne kommt der Prozeß zum Stillstand. Sonst weisen die Patienten keinerlei Gesundheitsstörungen auf.

Der Katalase-Index (die auf 1 Erythrozyten bezogene Fermentaktivität) ist bei Personen mit Akatalasämie gleich Null. Das Enzym fehlt anscheinend im gan-

zen Organismus.

Die Diagnose der Akatalasie ist relativ einfach. Während nach Zugabe von H_2O_2 zu normalem Blut keine Farbänderung auftritt und sich lebhaft Gas entwickelt, färbt sich katalasefreies Blut sofort dunkelbraun; eine Gasentwicklung fehlt. Die Farbänderung beruht darauf, daß das Hämoglobin zu Hämiglobin oxidiert wird (1; 2).

Bei den meisten Krankheiten ist der Katalasegehalt des Blutes normal. Perniciöse Anämie, Hepatitis und Krebs zeigten uncharakteristische Veränderungen der Fermentwerte (5). Dem Katalasegehalt des Blutes kommt also, abgesehen von der Akatalasie, keine klinische Bedeutung zu.

Die Wirkung der Radiotherapie bei Malignomen beruht nach WARBURG darauf, daß H_2O_2 infolge der verringerten Katalase-Aktivität in dem bestrahlten Gewebsteil eine hemmende Wirkung auf das Tumorstwachstum entfalten kann (1).

Krebszellen sind wegen ihres Katalasemangels empfindlicher gegen H_2O_2 als normale Körperzellen. Da man nun weiß, daß Röntgenstrahlen in Wasser bei Anwesenheit von Sauerstoff Wasserstoffperoxyd bilden nach der Bilanzgleichung



so lag die Idee nahe, daß Röntgenstrahlen, das wirksamste Krebstherapeutikum der Medizin, die Krebszellen durch nichts anderes schädigen als durch H_2O_2 ; und zwar selektiv, weil die Krebszellen weniger Katalase enthalten als normale Zellen.

Die Strahlenempfindlichkeit der Krebszellen müßte sehr erheblich steigen, wenn man während der Bestrahlung die roten Blutzellen fernhalten könnte, die eine enorme Menge an Katalase enthalten (9).

Bestimmung der KATALASE im Blut

BONNICHSEN, R. K., CHANCE, B. und THEORELL, H.: Acta Chem. Scand.
1 (1947) 685

Prinzip

Man läßt Katalase auf eine H_2O_2 -Lösung einwirken und bestimmt in gewissen Zeitabständen die Konzentration des verbliebenen H_2O_2 .

Reagentien

1. Wasserstoffsuperoxydlösung: 0,7 ml "Perhydrol" in 50 ml H_2O
2. Phosphatpuffer 0,01 M; pH 7
3. Schwefelsäurelösung, 2 %ig
4. Permanganat 0,01-n

Ausführung

2 ml Wasserstoffsuperoxydlösung werden zu 50 ml Phosphatpuffer in einen Erlenmeyerkolben gegeben. Eine Probe von 2 ml wird abgenommen, in eine 2 %ige Schwefelsäurelösung ausgeblasen und mit 0,01-n Permanganat titriert, um die Ausgangskonzentration an H_2O_2 zu bestimmen.

Die Katalaselösung wird in dem Phosphatpuffer auf etwa $1 \mu\text{Mol}$ verdünnt und ihre optische Dichte auf dem Gipfel der Soret-Bande im Beckman-Spektrophotometer gemessen. Etwa 0,03 ml dieser Lösung werden in ein Uhrglas pipettiert. Gleichzeitig wird die Stoppuhr gestartet, das Uhrglas wird in das Gefäß gesenkt, welches das Substrat enthält, und die Flüssigkeit in dem Gefäß wird rasch gerührt.

Nach 13 sec entnimmt man eine Probe von 2 ml und bläst sie in eine 2 %ige Schwefelsäurelösung. Die Zeit, bei welcher die Pipette ausgeblasen ist, wird notiert. Werden saubere Pipetten benutzt, so ist der Fehler zwischen den verschiedenen Pipetten geringer als 11 %. Eine zweite Probe wird nach 28 sec und eine dritte nach 43 sec abgenommen. Die Werte für K_1 werden durch Gleichung (XI) errechnet und können nach Belieben extrapoliert werden nach $t = 0$.

Ein befriedigendes Alternativverfahren besteht darin, die erste Probe wenige Sekunden nach Zugabe des Enzyms abzunehmen und dann eine zweite Probe 15 sec später zu nehmen. K_1 wird berechnet, indem man den Mittelwert der beiden Werte für die Wasserstoffperoxydkonzentration und das Zeitintervall zwischen den Messungen benutzt. Obwohl man annimmt, daß K_1 während dieses Intervalls eine Konstante erster Ordnung ist, hat diese Methode den Vorteil, daß die niedrige Geschwindigkeit bei der Mischung von Enzym und Substrat keinen Fehler verursacht und daß der Fehler, welcher die Einhaltung der Zeit betrifft, nur der Fehler zwischen zwei Messungen ist.

In anderen Fällen wurde die Reaktion gestoppt durch Einblasen einiger ml Schwefelsäure in das Reaktionsgefäß zur gewünschten Zeit. Mit dieser abgeänderten Methode wurde jedoch kein wesentlicher Unterschied bei den Werten für K_1 gefunden.

Berechnung

Die Katalase-Aktivität wird berechnet aus der Gleichung

$$K_1 = \frac{2,3 \log_e \cdot \frac{x_0}{x}}{e \cdot t} \quad (XI)$$

(siehe Gleichung (XII): $\log_e \cdot \frac{x_0}{x} = K_1 \cdot e \cdot t$)

statt sie als Kat. F $K_1 = 3,5 \cdot 10^7$ und $3,0 \cdot 10^7$ Liter $\cdot$ Mol⁻¹ $\cdot$ sec⁻¹
für Pferdeblut bzw. ¹ für Leberkatalase bei 22 Grad C auszudrücken.

Bestimmung der KATALASE in Leukozyten

FRISCH-NIGGEMEYER, W.: Enzymologie (Den Haag) (1954) 245

Vorbereitung

Nach der Vorschrift von LI und OSGOOD (17) wird durch ein Phytohämagglutinin aus Phaseolus vulgaris eine Differentialzentrifugation ermöglicht, bei der die Leukozyten auf schonende Weise isoliert werden können.

a) Herstellung des Phytohämagglutinins aus Phaseolus vulgaris:

100 g weiße Bohnen werden mit 500 ml 0,85 %iger Kochsalzlösung 24 Std lang eingeweicht. Hierauf wird im Star-Mix gut homogenisiert; die Zellreste werden abzentrifugiert. Die überstehende Lösung wird mit Ammoniumsulfat bis zu einem Sättigungsgrad von 0,68 versetzt und längere Zeit bei 15000 U/min zentrifugiert. Das Sediment wird verworfen und die überstehende Lösung mit Ammonsulfat auf einen Sättigungsgrad von 0,85 gebracht. Es wird wiederum zentrifugiert und dieses Sediment dann in ca. 1/10 des Volumens nach der ersten Zentrifugation von 1/15 M Phosphatpuffer, pH = 7,1, gelöst. Man erhält eine viskose opalisierende Lösung, die im Kühlschrank monatelang haltbar ist. Sie muß vor der Verwendung im Verhältnis 1 : 10 mit Wasser verdünnt werden.

b) Gewinnung der Leukozyten:

7 ml frisches Blut werden mit 0,2 ml Agglutininlösung (Stammlösung 1 : 10 verdünnt) versetzt und 5 min stehen gelassen. Hierauf wird in einer Winkelzentrifuge bei 600 U/min 2 min lang zentrifugiert und nachher wieder 10 min lang stehen gelassen. Das Sediment besteht aus zusammengeballten Erythrozyten, von denen die überstehende Flüssigkeit, die Leukozyten und Thrombozyten enthält, mittels einer Injektionsspritze vorsichtig abgesaugt

wird. Sie wird nun mit dem gleichen Volumen doppelt isotoner Ringerlösung versetzt und 10 min lang in einer normalen Zentrifuge bei 1200 U/min zentrifugiert. Die hypertone Ringerlösung verhindert das Zusammenballen der Leukozyten. Die überstehende Flüssigkeit, die die Thrombozyten enthält, wird wieder mit der Spritze abgesaugt und das Sediment vorsichtig mit 5 ml 1,5-fach isotoner Ringerlösung überschichtet. Durch vorsichtiges Schütteln bringt man die Leukozyten in Suspension, während etwa noch vorhandene Erythrozyten im untersten Teil des Sedimentes verbleiben. Diese Prozedur wird noch zweimal wiederholt und man erhält schließlich eine Suspension lebender Leukozyten in 1,5-isotoner Ringerlösung, die ca. 3 - 5 % Erythrozyten enthält. Ein Tropfen dieser Suspension wird ohne Verdünnung in eine Zählkammer eingebracht und die Anzahl der Leukozyten bestimmt. Eine Phasenkontrasteinrichtung erwies sich hierbei als vorteilhaft. Die Proben enthalten meistens 2 - 4 Millionen Leukozyten im Milliliter.

c) Freisetzung des Enzyms:

Die Katalase wird durch zwei Stunden langes Einfrieren der Leukozyten-suspension bei -20 Grad C in Freiheit gesetzt. Nach dem Auftauen zeigt sich meist ein zusammenhängender Schleier aus Leukozytenstromata, der aber leicht durch Schütteln in eine homogene Suspension gebracht werden kann. Die Fermentaktivität dieser Suspension wird gemessen. Durch Zusatz von oberflächenaktiven Substanzen (18) kommt man zu denselben Werten.

Aktivitätsbestimmung der Katalase (16)

Prinzip

Die Methode besteht darin, daß aus einem Versuchsansatz, bestehend aus mit Puffer verdünntem H_2O_2 , in regelmäßigen Zeitabständen Proben entnommen werden. Die enzymatische Reaktion wird mit Schwefelsäure gestoppt; die Probe mit Permanganatlösung versetzt. Durch das noch nicht abgebaute Wasserstoffperoxyd wird ein entsprechendes Teil des Permanganates zersetzt; der Überschuß wird nun kolorimetrisch bestimmt. Diese Methode läßt sich bedeutend schneller durchführen als die üblichen Titrationsen.

Reagentien

1. Wasserstoffperoxydlösung 0,01-n
2. Phosphatpuffer 0,0067 m; pH 6,8
3. Schwefelsäure, 5-n
4. Kaliumpermanganatlösung, 0,005-n

Ausführung

55 ml Wasserstoffperoxydlösung in Phosphatpuffer von pH = 6,8 kommen in ein Gefäß, das mit Rührer, Abblahn und Kühlmantel versehen ist. Die Kühlung erfolgt mit fließendem Leitungswasser. Nach 15 - 20 min ist die Lösung genügend vorgekühlt (10 Grad C). Eine Probe von 5 ml wird entnommen und in ein vorbereitetes Reagenzglas mit 2 ml Schwefelsäure gebracht. Dies dient zur Bestimmung der Ausgangsmenge an H_2O_2 . Nun wird rasch 1 ml gerade aufgetaute Leukozytensuspension zugefügt und dieser Zeitpunkt notiert. Nach 3, 6, 9 und 12 min Inkubation werden je 5 ml entnommen und zwar so, daß sie durch den Abblahn in bereits mit 2 ml Schwefelsäure versehene Meßgläser eingelassen werden. Dann kommt der Reihe nach in jedes Reagenzglas 10 ml Kaliumpermanganatlösung. Es wird gut gemischt und im photoelektrischen Kolorimeter bei einer Schichtdicke von 10 mm und mit Grünfilter die Extinktion bestimmt. Die Messung muß innerhalb von 100 sec, von der Zugabe des Permanganats gerechnet, stattfinden, da später bei geringen Farbinintensitäten Trübungen auftreten. Aus einer Eichkurve kann man nun auf die verbleibende Menge Wasserstoffperoxyd (in ml) schließen, die zum Zeitpunkt der Probeentnahme vom Ferment noch nicht zersetzt wurde. Nach der Gleichung:

$$\frac{1}{t_{(\text{min})}} \quad \log \quad \frac{c_c}{c_c - c_t} = K_t$$

läßt sich für jede Probe die Geschwindigkeitskonstante der Reaktion zur Zeit t berechnen. Der arithmetische Mittelwert wird nun in die Gleichung für Kat. v eingesetzt. Kat. v ist nach EULER und JOSEPHSON (15) das sog. Katalase-Vermögen = K_t/Z , wobei Z die Anzahl der im Versuchsansatz befindlichen Leukozyten darstellt.

Die Katalase-Aktivität zeigte bedeutende individuelle Schwankungen. Die Kat. v -Werte liegen zwischen 25 und $120 \cdot 10^{-10}$. Mehr als die Hälfte der Werte liegen zwischen 70 und $100 \cdot 10^{-10}$, wobei die Kurve der Häufigkeitsverteilung gegen höhere Werte einen wesentlich steileren Abfall aufweist als gegen niedere.

Literatur

- 1) Abderhalden, R.: Klinische Enzymologie p.132 ff., G.Thieme Verlag (1958)
- 2) Abderhalden, R.: Klinische Enzymologie p.196, G.Thieme Verlag (1958)
- 3) Allison, A.C. und Burn, G.P. (1955): zitiert bei Paul, K.G. und Engstedt, L.M.: Scand. J. Clin. Lab. Invest. 10 (1958) 26
- 4) Behrendt, H.: Chemistry of Erythrozytes p.203 ff., C.C.Thomas, Publ., Springfield, Ill. (1958)
- 5) Heller, H.: zitiert bei 1)
- 6) Perlmann, G.E. und Lippmann, F. (1945): zitiert bei 3)
- 7) Takahara, S. und Miyamoto, H.: zitiert bei 2), p.196
- 8) Vernon, H.M.: zitiert bei 3)
- 9) Warburg, O. et al.: Arch. Biochem. Biophys. 78 (1958) 573
- 10) Waentig, P. und Steche, O. (1913): zitiert bei 3)

Bestimmung

- 15) Euler, H.v. und Josephson, K.: Ber. Dtsch.Chem.Ges. 59 (1926) 770
- 16) Goldblith, S.A. und Proctor, B.E.: J.Biol. Chem. 187 (1950) 705
- 17) Li, J. und Osgood, E.E.: Blood 4 (1949) 670
- 18) Rossiter, R.J.: J. Physiol. 110 (1949) 136

MILCHSÄURE-DEHYDROGENASE

Das Enzym katalysiert die reversible Reaktion



Das Gleichgewicht liegt dabei weit auf der Seite der Reduktion. Die physiologische Bedeutung der Milchsäure-Dehydrogenase (MDH) ergibt sich aus ihrer zentralen Stellung in der Glykolyse, die ja unter anderem die Hauptenergiequelle für die Funktion der Erythrozyten bildet (4a).

Das Ferment ist im Organismus weitverbreitet.

Erythrozyten (9) und Leukozyten (17) enthalten das Enzym in großen Mengen. Die Fermentaktivität in den Leukozyten liegt etwa um das 40fache höher als die der Erythrozyten. Hingegen ist die Plasma-Aktivität relativ gering, sie beträgt durchschnittlich 440 (200 - 680) Einheiten nach Untersuchungen von WROBLEWSKI und Mitarbeitern (1).

MDH ist in der α_1 , α_2 und β -Globulinfraction des Serums nachweisbar. Anscheinend gibt es mehrere voneinander verschiedene Milchsäure-Dehydrogenasen. VESELL und BEARN (21) fanden in den auf elektrophoretischem Wege getrennten Fraktionen der Serum-Proteine (α_1 , α_2 und β -Globulin) und im Hämolysat menschlicher Erythrozyten drei verschiedene Gipfel der MDH-Aktivität. In zwei Fällen von Herzinfarkt, bei denen die Gesamtaktivität der MDH gesteigert war, fand sich ein verschieden einheitlich erhöhter α_1 -Aktivitätsgipfel.

In drei Fällen von Leukämie dagegen war der prozentuale Anteil im α_2 -Gipfel einheitlich erhöht, obwohl die MDH-Gesamtaktivität nur in einem Fall vermehrt war (21).

Das Serum von Kindern enthält im allgemeinen mehr MDH als dasjenige der Erwachsenen. Erst zur Zeit der Pubertät sinkt der Fermentspiegel auf jene Höhe ab, die offenbar während des ganzen Lebens beibehalten wird.

Geschlechtsunterschiede bestehen nicht. Auch Hunger hat keinen Einfluß auf den Enzymgehalt, ebenso wenig die Durchführung von Glukosetoleranzprüfungen bei Gesunden oder Diabetikern (1).

Die MDH des Serums wird durch Galle, Darm und Urin ausgeschieden (6; 12; 18).

Thrombozyten enthalten die MDH nur zu einem verschwindend geringen Prozentsatz, so daß man sie bei Fermentbestimmungen in weißen Blutkörperchen vernachlässigen kann (17).

Die MDH wurde 1943 von KUBOWITZ und OTT in kristallisierter Form dargestellt (1).

Das Ferment ist ein Zink-Protein (20). Serum-Zink sinkt signifikant innerhalb eines Tages nach Beginn eines Herzinfarktes und kehrt erst nach etwa 2 Tagen zur Norm zurück (20).

Das Molekulargewicht der MDH beträgt etwa 100 000. Ihr pH-Optimum beläuft sich auf 7,4 bei 39 Grad C, bei 20 Grad auf 8,0. In wässriger Lösung ist das Ferment sehr unbeständig, während es in einer 0,1 n gesättigten Ammonsulfatlösung, bei 0 Grad C aufbewahrt, auch nach 6 Wochen noch keine Abnahme seiner Wirksamkeit zeigt. Beim Einfrieren von dehydrogenasehaltigen Geweben und Flüssigkeiten bleibt die Aktivität des Fermentes offenbar unbegrenzt erhalten. Quecksilberchlorid und p-Chlormercuribenzoat bewirken eine Inaktivierung der MDH, die sich mit Hilfe von Sulfhydrylverbindungen wieder rückgängig machen läßt (1). Schlangen- und Bienengifte hemmen die MDH noch in millionenfacher Verdünnung (7).

Im Oxalatplasma findet man etwas niedrigere Fermentwerte als im Heparinplasma. Man vermutet deshalb, daß Oxalat eine hemmende Wirkung auf das Enzym ausübt (1).

Der MDH-Spiegel ist bei Neugeborenen beträchtlich höher als im mütterlichen Blut. Die Enzymwerte der Mütter liegen nach der Geburt in demselben Bereich wie die normalen Seren (3). Die erhöhte MDH-Aktivität im Serum leukämischer Patienten und gesunder Kinder läßt eine Beziehung zwischen MDH und Wachstum vermuten (5).

Klinik

Bei chronischen Myelosen, unbehandelten Lymphadenosen und akuten Leukosen steigt der MDH-Spiegel im Serum mit fortschreitender Erkrankung an, während die Fermentaktivität in den Leukozyten gegen die terminalen Stadien hin abnimmt (4; 17). Die MDH ist, wie auch die Glutaminsäure-Dehydrogenase (14a) und die Triosephosphat-Dehydrogenase, in leukämischen Leukozyten etwa proportional der Verminderung der Glykolyse in ihrer Aktivität redu-

ziert (19). Die Enzymwerte in den Erythrozyten waren dabei normal (4; 17). Nach zytostatischer Behandlung (Myleran) gingen die Serumwerte im Sinne einer Normalisierung zurück (17). Entzündliche und andere reaktive Leukosen gingen niemals mit einer solchen Erhöhung der MDH im Plasma einher, was für die Differentialdiagnose von Bedeutung ist. Bei den reaktiven Leukozytosen sind die Fermentwerte in den Leukozyten normal (15).

Auf Grund der Erniedrigung des Ferments in den Leukozyten und seiner gleichzeitigen Erhöhung im Serum nimmt man an, daß die Serum-Aktivität durch den bei Leukosen erhöhten Zellumsatz und die verstärkte Zellmauserung bedingt ist (17). Ein ähnlicher Mechanismus dürfte auch der erhöhten MDH-Aktivität im Serum bei fortgeschrittenen Carcinosen zugrunde liegen (10; 14).

Auf einen Zusammenhang der gesteigerten Serumaktivität der MDH mit der Blutmauserung deutet auch der bei Rindern im Milzvenenblut gegenüber anderen Gefäßprovinzen erhöhte Fermentspiegel (11).

Auch zahlreiche andere Blutkrankheiten gehen mit einer gesteigerten Aktivität der MDH im Serum einher: so z.B. die Sichelzellanämie (14a), die Marchiafava-Anämie, Thrombozytopenien und akute hämolytische Syndrome (24), infektiöse Mononukleose (15).

Die perniciöse Anämie zeigt eine starke Steigerung der MDH im unbehandelten Zustand (9; 14). Bei behandelter oder gut eingestellter Perniciosa sind die MDH-Werte normal oder nur leicht erhöht.

Der MDH-Spiegel ist ebenfalls erhöht bei einer beträchtlichen Anzahl anderer Krankheiten wie disseminierten Lymphomatosen und Carcinomatosen (5; 25), akuten Hepatitiden (2; 9; 13; 28), Leberzellnekrose (5; 14; 15), Verschlußikterus (2) und Lymphdrüsen-Tbc, sowie gelegentlich bei akuten Nierenerkrankungen, Dermatomyositis, akuter Pankreatitis und anderen Krankheitszuständen mit Austritt von intrazellulären Enzymen (25).

Hochfieberhafte Infektionen zeigten einen Anstieg der MDH im Serum in den ersten Tagen. Dabei ist die Enzymreaktion bei akuter Infektion unabhängig von der Art des Erregers und dem betroffenen Organ (8).

Herzoperationen (8) sowie Gehirninfrakt (15; 23) und Gehirnblutungen (13) sind ebenfalls von einer vermehrten MDH-Aktivität im Serum begleitet.

Von besonderer Bedeutung ist die Erhöhung des Serumfermentspiegels beim Herzinfarkt (15; 21-26). Nach WROBLEWSKI (25) ist die Aktivität der Serum-MDH dabei auf das 2-10fache der Norm erhöht. Mehr als 3000 Einhei-

ten (nach WROBLEWSKI und LA DUE) gelten als prognostisch ungünstig. Der Anstieg erfolgt später als bei SGOT und bleibt auch länger erhöht als die Transaminase. MDH erreicht die höchsten Werte im Serum in den ersten 4 Tagen nach Infarktbeginn. In den folgenden 2 Tagen fallen die Werte dann relativ schnell, später wesentlich langsamer ab. Nach etwa 2 Wochen sind sie wieder normal (2; 8).

Die Bestimmung der MDH im Serum ist für die Diagnose des Myokardinfarkts besonders wertvoll, weil die MDH stärker und länger dauernd von der Norm abweicht als die SGOT. Dieses spielt vor allem dann eine Rolle, wenn die Patienten erst einige Tage nach dem Infarkt zur Untersuchung kommen. Ein weiterer Vorzug ist die im Vergleich zu den Transaminasen einfachere Bestimmungsmethode der MDH (15; 23).

In den Erythrozyten ist die Aktivität der MDH etwa 100mal höher als im Serum (9). Bei akuter Hepatitis, Verschlúßikterus und Leberzirrhose ist das Ferment in den Erythrozyten vermehrt, beim Coma hepaticum sogar stark erhöht (5). Auch die perniziöse Anämie zeigt eine gesteigerte MDH-Aktivität der roten Blutzellen (5a; 8a).

Kinder mit zyanotischer kongenitaler Herzkrankheit wiesen eine normale MDH-Konzentration pro Einzel-Erythrozyt auf (4a).

Da die MDH bei vielen Krankheiten im Serum vermehrt ist, kommt einer gesteigerten Aktivität also keine spezifische Bedeutung für einen bestimmten Krankheitsprozeß zu (12). Ganz allgemein kann man sagen, daß jede Ursache einer Gewebszerstörung die Erhöhung des Fermentspiegels zur Folge haben kann. Darum empfiehlt sich zur Klärung differential-diagnostischer Fragestellungen die gleichzeitige Bestimmung verschiedener Fermente (2).

Die Bestimmung der MDH kann von Nutzen sein bei der Differentialdiagnose zwischen Tumor und Leukose. Im Tumorgewebe ist die MDH vermehrt, in den Leukosezellen hingegen eher vermindert, vor allem in den fortgeschrittenen Stadien. Nach erfolgreicher Behandlung der Leukosen steigen die erniedrigten Werte wieder zur Norm an (8).

Wertvoll ist die MDH-Bestimmung auch für die Unterscheidung zwischen maligner oder benigner Form des Ikterus. Normale oder gering erhöhte MDH-Werte im Serum schließen zwar ein Malignom nicht aus; Werte über $10 \mu\text{Mol/ml Serum/Std}$ (12) und besonders im Verlauf der Erkrankung ansteigende Werte sind jedoch auf malignen Verschluß oder Lebermetastasen verdächtig (12).

Eine nützliche Ergänzung stellt bei dieser Differentialdiagnose die Bestimmung der Brenztraubensäure im Serum dar. Die klinische Verdachtsdiagnose einer malignen Ikterusform wird durch hohe BTS-Werte in Verbindung mit dem Konstellationstyp SMDH $\triangleright$ SGOT $\triangleright$ SGPT weitgehend gesichert. Schwierigkeiten in der Bewertung treten gelegentlich bei Patienten mit hochgradigen kardialen Insuffizienzzeichen auf, da auch hier der BTS-Spiegel im Serum stark ansteigt (12).

Bestimmung der MILCHSÄURE-DEHYDROGENASE im Serum

HORN, H.D. und AMELUNG, D.: Dtsch. Med. Wschr. 82 (1957) 619

Prinzip

Der Nachweis und die quantitative Bestimmung der MDH beruhen auf dem Prinzip des optischen Testes von WARBURG, wie er schon mehrfach im Rahmen dieser Arbeit beschrieben wurde. Der Ablauf fermentchemischer Reaktionen, bei denen die reduzierte Form des DPN verbraucht wird, läßt sich in einem Spektralphotometer bei 340 $m\mu$ verfolgen, da DPN ox. im Wellenbereich von 300 - 400 $m\mu$ keine Lichtabsorption zeigt. Es kommt also parallel zum Übergang von DPNH in DPN zu einer Abnahme der Lichtabsorption. Fermentreaktionen, die kein DPNH verbrauchen, lassen sich dann erfassen, wenn eines der Reaktionsprodukte durch eine zweite, DPN-abhängige Enzymreaktion bestimmbar ist. Die Änderung der Lichtabsorption pro Zeiteinheit ist dabei jeweils der Aktivität des die Reaktion katalysierenden Fermentes proportional.

Reagentien

1. 0,1 m Tris-HCl-Puffer, pH 7,4

Zu 12,11 g der käuflichen Substanz (Trishydroxymethylaminomethan) werden 85 ml n HCl gegeben und dann mit Aqua bidest. auf 1000,0 aufgefüllt. Der pH muß kontrolliert werden.

(Statt Trispuffer kann man nach HILL und LEVI (41) ebensogut Phosphatpuffer (0,1 m, pH 7,8) verwenden.)

2. 0,03 m Na-Pyruvatlösung

354 mg der käuflichen, ca. 94 %igen reinen Verbindung werden mit Aqua bidest. ad 100,0 gebracht.

3. DPNH-Lösung

10 mg des 63 %igen Präparates werden in 1 ml Aqua bidest. gelöst.

4. MDH-Suspension

(MDH-Boehringer, aus Skelettmuskel gewonnenes Präparat. 1 ml der käuflichen Suspension enthält etwa 5 mg Enzymprotein in 0,6 gesättigter Ammonsulfatlösung.)

Die Substratlösungen sind, im Kühlschrank aufbewahrt, etwa 4 bis 5 Tage haltbar. Die Ferment-Suspensionen müssen ebenfalls in der Kälte aufbewahrt werden, ihre Aktivität ist in dreiwöchigem Abstand zu kontrollieren.

Die Reagentien bzw. Fermente wurden von folgenden Firmen bezogen: Tris vom Serva-Labor, Heidelberg (Hersteller: Sigma Chemical Co., Saint Louis). -

Na-Pyruvat, α -Ketoglutar säure, DPNH, MDH-Suspension von der Fa. C.F. Boehringer Söhne, Mannheim-Waldhof.

Ausführung

Die Blutproben werden in den frühen Vormittagsstunden entnommen. Auf Hämolysefreiheit der Seren ist unbedingt zu achten, da die Fermentaktivitäten der Erythrozyten im Normalblut höher sind als die des Serums. Aus diesem Grund sollen die Seren innerhalb einer Stunde nach der Blutentnahme zentrifugiert und abpipettiert werden. Im vom Blutkuchen getrennt aufbewahrten Serum bleiben die Aktivitätswerte unter bestimmten Bedingungen eine gewisse Zeit konstant. Die MDH-Aktivität behält ihren Wert bei 4 Grad C über 24 Stunden und in gefrorenem Zustand über mindestens eine Woche (40).

Die Bestimmung wird bei 25 Grad C $\pm$ 1 Grad vorgenommen. Der Extinktionsablauf wird im Photometer Eppendorf mit dem Hg-Filter bei 366 m μ und einer Schichtdicke von 1 = 10 mm gemessen. Die pH-Bestimmungen werden mit der Glaselektrode (pH-Meßgerät der Firma Metrohm-A.G., Herisau/Schweiz) durchgeführt.

In eine 10 mm-Küvette werden nacheinander eingebracht: 2,3 ml Tris-HCl-Puffer, 0,1 ml DPNH, 0,5 ml Serum 1 : 5 verdünnt mit Aqua bidest. Nach einer Vorinkubationsperiode von etwa 30 Min, während der die anderen DPNH-verbrauchenden Reaktionen ablaufen, wird die Aktivitätsmessung durch Zugabe von 0,1 ml Na-Pyruvat gestartet. Die Messung der Extinktionsabnahme erfolgt gewöhnlich in Abständen von 1 Minute (Stoppuhr!), bei höheren SMDH-Aktivitäten können kürzere Abstände (20 - 30 Sekunden) zwischen den einzelnen Ablesungen erforderlich werden. Eventuell muß das Serum weiter verdünnt werden. Da die DPNH-Konzentration der limitierende Faktor des Reaktionsablaufes ist, beobachtet man bei hohen Enzymaktivitäten eine rasche Abnahme der Reak-

tionsgeschwindigkeit, so daß auch bei kurzen Ablesungsintervallen kein konstanter Umsatz stattfindet. In diesen Fällen ist eine weitere Verdünnung des Serums erforderlich.

Berechnung

Der Berechnung der Fermentaktivität wird der Extinktionskoeffizient von DPNH zugrunde gelegt. Er beträgt bei der Wellenlänge 366 m μ und der Schichtdicke d = 10 mm:

$$3,4 \cdot 10^6 \text{ cm}^2 \cdot \text{Mol}^{-1}$$

Danach entspricht einer Extinktionsabnahme von $\Delta E_{366} = 0,01$ ein Substratumsatz von 0,0029 μMol pro ml Testansatz. Die Größe des Substratumsatzes ist dabei das Maß für die Fermentaktivität, die man in μMol Substratumsatz / ml Serum/Stunde angibt. Danach muß im Reaktionsansatz die pro Minute gemessene Extinktionsdifferenz ΔE_{366} unter Berücksichtigung der im Testansatz vorhandenen Serummenge von 0,1 ml und des Testvolumens von 3 ml mit dem Faktor

$$F = 10 \cdot 60 \cdot 3 \cdot 0,0029 = 5,22$$

multipliziert werden. Die Aktivität der MDH beträgt danach ΔE_{min} 5,22 μMol Substratumsatz / ml Serum / Stunde.

Bestimmung der MILCHSÄURE-DEHYDROGENASE in Leukozyten

REMY, D. und WIEDING, J.: Ärztl. Forschg. 11 (1957) I/399

A. Aufbereitung des zu testenden Materials

18 ml aus der Vene entnommenes Blut werden in einer vorher mit 2 ml Vetren liquidum (Promonta) versehenen Glasspritze aufgezogen und vorsichtig durchmischt. 5 ml Vetrenblut werden sofort 15 Minuten lang mit 2500 Umdrehungen zentrifugiert, das überstehende Plasma abgehoben und später gefroren, um zur gesonderten Bestimmung der Aktivität im Plasma verwandt zu werden. Die restlichen 15 ml Vetrenblut werden in ein Reagenzglas gefüllt, in welchem Blut mit hoher Senkungsgeschwindigkeit unmittelbar bei 4 Grad C sedimentiert. Bei niedriger Senkung wird es bei Zimmertemperatur mit einem Neigungswinkel des Röhrchens von 30 Grad aufgestellt, um die Sedimentation zu beschleunigen. Nach spätestens 30 bis 90 Minuten wird der leukozytenangereicherte Überstand abgehoben. Bei Nichtleukämikern mit normalen

Leukozytenzahlen und niedriger Blutsenkungsgeschwindigkeit verwendet man an Stelle der üblichen Reagenzgläser 10 cm lange Glasröhrchen mit einer Weite von 0,7 cm, in denen sich auf Grund des geringen Durchmessers der Blutsäule die Trennung der Erythrozyten vom Überstand rascher vollzieht. Gegebenenfalls wird ein größeres Volumen Blut auf 2 oder 3 Röhrchen verteilt. Der leukozytenangereicherte Überstand weist regelmäßig rote Blutkörperchen auf, die bei REMY und WIEDING in einem Verhältnis weiß zu rot von 1 : 0,5 bis 1 : 1,5 auftraten.

Eventuell muß der leukozytenangereicherte Überstand um das Ein- bis Dreifache seines Volumens mit quartzdestilliertem Wasser verdünnt werden, um Schwankungen in der Zellzahl nach oben auszugleichen. Andererseits wird eine Verdünnung erforderlich, wenn sich bei niedriger Blutsenkungsgeschwindigkeit nach einer Sedimentationszeit bis zu 90 Minuten ein Überstand von nur 3 bis 4 ml gebildet hat, der auf das zur Homogenisation erforderliche Volumen von 6 ml aufgefüllt werden muß. Man bestimmt die Zellwerte jeweils durch 2 Zählungen aus zwei verschiedenen Pipetten. Während der Aufbereitung und Zellzählung bleiben die Ansätze bei einer Temperatur von 4 Grad C. Sie werden anschließend im Acetoneisbad gefroren, wieder aufgetaut und im Schneidmesser-Homogenisator (Bühler, Tübingen) 2 Minuten lang zerkleinert. Nach der Homogenisation sind 85 % der im Ansatz befindlichen Leukozyten zerstört. Erythrozyten ließen sich nicht mehr nachweisen. Das Homogenisat wird erneut zweimal im Acetoneisbad gefroren und wieder getaut. Falls eine Trübung in der Suspension auftritt, wird sie mit 15 000 Umdrehungen im Kühlraum ohne nachweisbare Einbuße der Aktivität abgeschleudert. Bei der hochgradigen Verdünnung der Aufbereitungen in der Küvette um das 100- bis 150fache bei Leukozytensuspensionen und um das 30fache bei Plasmauntersuchungen ist ein Trübungseffekt praktisch nicht zu beobachten, so daß die meisten Homogenisate ohne Beeinträchtigung des Reaktionsablaufes unmittelbar nach dem letzten Auftauen getestet werden können. Die Plasmaaufbereitungen werden nicht homogenisiert. Die in der Suspension noch vorhandenen Erythrozyten haben keinen Einfluß auf die Größenordnung des Meßergebnisses.

B. Die Aktivitätsbestimmung erfolgt im Prinzip nach der oben beschriebenen optischen Methode (s. MDH-Bestimmung im Serum). Man hält sich an das von KUBOWITZ und OTT (42) mitgeteilte Verfahren, nach welchem die Abnahme der Lichtschwächung in bestimmten Zeitintervallen gemessen wird. In Abhängigkeit von der Reaktionsgeschwindigkeit wird alle 15, 30 und 60 Sekunden abgelesen.

Standardisierung

Als Einheit der Fermentaktivität gilt die unter Standardbedingungen gemessene Extinktionsänderung, ausgedrückt in

$$\Delta E (\log I_0/I = 0,001), \text{ bezogen auf 1 Minute und 1 ml}$$

der Aufbereitung.

Die Fermentaktivität wird ausgedrückt durch die unter den Standardbedingungen gemessene Extinktionsabnahme für 1 min / 1 ml bzw. 10^5 Zellen pro ml der Aufbereitung. Es ist zu berücksichtigen, daß die Zellzahl pro ml einzusetzen ist, mithin die zunächst auf mm^3 errechneten Zellwerte mit 1000 zu multiplizieren sind.

Aus den molaren Extinktionskoeffizienten von DPN ergibt sich die Möglichkeit, den Umsatz von Brenztraubensäure zu Milchsäure in Molen auszudrücken ($\Delta E = 0,87$ Mikro-Mol. Substratumsatz).

Da die Testlösungen zum Teil eine Suspension von Zellen im Plasma darstellen, wird die Leukozytenaktivität um den Plasmawert des Ansatzes korrigiert, der gleichzeitig getrennt mitgemessen wird.

Literatur

- 1) Abderhalden, R.: Klinische Enzymologie p.89 ff., G. Thieme Verlag (1958)
- 2) Amelung, D. und Horn, H.D.: Dtsch. Med. Wschr. (1956) 1701
- 3) Antonini, E. et al.: Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. 32 (1956) 589
- 4) Beck, W.S.: J. Biol. Chem. (1955): zitiert bei 16)
- 4a) Behrendt, H.: Chemistry of Erythrocytes, p.188 ff., C.C. Thomas, Publ., Springfield, Ill. (1958)
- 5) Bierman, H.R. et al.: Cancer Research 17 (1957) 660
- 5a) Bock, H.E. et al.: Klin. Wschr. (1958) 56
- 6) Chinsky, M. et al. (1956): zitiert bei 12)
- 7) Fleckenstein, A. und Gayer, J.: Klin. Wschr. (1950) 789
- 8) Hauss, W.H. und Leppelmann, H.J.: Klin. Wschr. (1957) 65
- 8a) Hennemann, H.H. und Klaus, D.: Klin. Wschr. (1958) 516
- 9) Hess, B. und Gehm, E.: Klin. Wschr. (1955) 91
- 10) Hill, B.R. und Levi, C. (1954): zitiert bei 16)
- 11) Hof, J. und Woller, I. (1956): zitiert bei 16)
- 12) Horn, H.D. und Amelung, D.: Dtsch. Med. Wschr. (1957) 619

- 13) Hsieh, K.M. und Blumenthal, H.T.: zitiert bei 1)
- 14) Lührs, W. und Negelein, E.: Klin. Wschr. (1956) 148
- 14a) Macdonald, R.P.: J. Amer. Med. Ass. 165 (1957) 35
- 15) Remy, D.: Dtsch. Med. Wschr. (1957) 899
- 16) Remy, D. und Wieding, J.: Ärztl. Forschg. 11 (1957) I/399
- 17) Remy, D. und Wieding, J.: Ärztl. Forschg. 11 (1957) I/389
- 18) Steinberg, D. und Ostrow, B.H.: zitiert bei 12)
- 19) Valentine, W.N.: Ann. Rev. Med. 6 (1955) 77
- 20) Vallee, B.L. und Wacker, W.E.C.: J. Amer. Chem. Soc. 78 (1956) 1771
- 21) Vesell, E.S. und Bearn, A.G.: Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 94 (1957) 96
- 22) Wacker, W.E.C. et al.: New Engl. J. Med. 255 (1956) 449
- 23) White, L.P.: New Engl. J. Med. 255 (1956) 984
- 24) Wroblewski, F. (1957): zitiert bei Hennemann, H.H. und Klaus, D.:
Klin. Wschr. (1958) 516
- 25) Wroblewski, F.: zitiert bei: Kongr. Zbl.ges.Inn.Med. 188 (1958) 167
- 26) Wroblewski, F. et al.: Science 123 (1956) 1122
- 27) Wroblewski, F. und La Due, J.S. (1955): zitiert bei 16)
- 28) Wroblewski, F. und La Due, J.S.: zitiert bei 12)

Bestimmung

- 40) Hill, B.R.: Cancer Research 16 (1956) 460
- 41) Hill, B.R. und Levi, C.: Cancer Research 14 (1954) 513
- 42) Kubowitz, F. und Ott, P.: zitiert bei 16)

5 - NUKLEOTIDASE



Das Enzym spielt eine Rolle im Stoffwechsel der Nukleotide, indem es aus 5-Nukleotiden, wie Adenosin-5-phosphorsäure und Inosin-5-phosphorsäure das Phosphat abspaltet.

Die Aktivität der 5-Nukleotidase innerhalb des physiologischen Bereiches ist mit Ausnahme der Darmschleimhaut viel ausgeprägter als die Aktivität der unspezifischen alkalischen Phosphatase. Man vermutet, daß dem Ferment eine Rolle bei der Calcifizierung zukommt (1).

Im Serum ist das Enzym nur in sehr geringen Mengen enthalten (höchstens 1,6 Bodansky-Einheiten) (1).

Auch in Leukozyten wurde das Ferment gefunden (3).

Das pH-Optimum der 5-Nukleotidase liegt bei 7,8 (1).

Klinik

Im Gegensatz zur unspezifischen alkalischen Phosphatase sind die Nukleotidase-Werte niedrig bei Rachitis, Morbus Paget, osteogenen Tumoren, Albright's Syndrom, Brustkrebs und spinalen Neoplasmen (1).

Beide Fermente zeigten hohe Aktivitätswerte bei Verschlußikterus und infektiösem Ikterus, Leberhämangiom, Lungen- oder Knochentuberkulose mit Amyloid und polycystischer Niere (1).

Bei Leberkrankheiten ist die Aktivität der 5-Nukleotidase gewöhnlich um das Hundertfache gesteigert. Knochenkrankheiten zeigen eine solche Erhöhung hingegen nicht. Darum hält man es für unwahrscheinlich, daß die 5-Nukleotidase des Serums aus den Knochen stammt (1).

Bestimmung der 5 - NUKLEOTIDASE im Serum

DIXON, Th. and PURDOM, M.: J. Clin. Path. 7 (1954) 341

Reagentien

1. Glycerophosphat-Puffer-Substrat pH 9,3

Natrium-beta-glycerophosphat 0,05 g und Natrium-Barbiton 0,424 g mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt, auf pH 9,3 gebracht und kalt aufbewahrt.

2. Glycerophosphat-Puffer-Substrat pH 7,5

Wie oben, abgesehen davon, daß das pH durch Zugabe von etwa 1,2 ml n HCl auf 7,5 gebracht wird.

3. Adenosin-5-phosphat-Puffer-Substrat pH 7,5

Adenosin-5-phosphat 0,087 g und Natrium-Barbiton 0,424 g mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt und der pH durch Zugabe von 1,2 ml n HCl auf 7,5 gebracht und kalt aufbewahrt.

4. Aminonaphthol-Sulfonsäure-Reagenz

195 ml 15 %iges Natriumbisulfit,
0,5 g 1,2,4-aminonaphthol-sulfonsäure und
5 ml 20 %iges Natriumsulfit

werden in zugestöpselten Gefäßen bis zur Auflösung geschüttelt, kalt aufbewahrt und innerhalb von vier Wochen verbraucht.

5. Molybdat-Reagenz

25 g Ammonium-molybdat p. A. werden in etwa 200 ml Wasser gelöst. In einen 1-Liter-Meßkolben gibt man 300 ml 10-n H_2SO_4 , fügt die Molybdatlösung hinzu und verdünnt mit Wasser auf 1 Liter.

6. Phosphat-Standardlösung

0,02195 g KH_2PO_4 und 50 g Trichloressigsäure werden auf 1 Liter aufgefüllt. Diese Lösung enthält 0,02 mg P in 4 ml.

Prinzip und Ausführung

Die unspezifische alkalische Phosphatase-Aktivität ist bei pH 9 hoch gegenüber Phenylphosphat, Adenosin-5-phosphat und β -Glycerophosphat in dieser absteigenden Reihenfolge (2). Bei pH 7,5 jedoch ist die gesamte Phosphatase-Aktivität gleich niedrig gegenüber Phenyl- oder Glycerophosphat und die höhere Aktivität gegenüber Adenosin-5-phosphat bei dieser Reaktion ist auf die spezifische 5-Nukleotidase zurückzuführen.

So wird die Aktivität der 5-Nukleotidase im Serum gemessen, indem man die unspezifische Phosphatase-Aktivität mit Glycerophosphat als Substrat bei

pH 7,5 von der gesamten Aktivität mit Adenosin-5-phosphat bei pH 7,5 abzieht.

Die nicht spezifische Phosphatase-Aktivität im Serum wird bestimmt durch Inkubation mit Glycerophosphat bei pH 9,3. Für die Testlösungen versetzt man 0,2 ml Serum mit 4,5 ml der entsprechenden kombinierten Puffer-Substrat-Mischung und 0,3 ml Wasser und inkubiert bei 37 Grad C zweieinhalb Stunden lang. Danach nimmt man die Gläser aus dem Thermostaten und versetzt sie sofort mit 1 ml 30 %iger Trichloressigsäure. Man läßt die Gläser einige Minuten stehen und filtriert. In einem anderen Glas wird ein Kontrollversuch in genau gleicher Weise angesetzt, jedoch ohne Inkubation. Zu je 4 ml des trichloressigsäuren Filtrates und der Phosphat-Standardlösung gibt man 0,5 ml Molybdat-Reagens, 0,2 ml Aminonaphthol-sulfonsäure-Reagens und 0,3 ml Wasser. Nach 15 min werden die Farbwerte im Spektrophotometer bei 660 m μ abgelesen.

Berechnung

Adenosin-5-phosphat-Puffer-Substrat

pH 7,5 = A

Glycerophosphat-Puffer-Substrat

pH 9,3 = G 9,3

Glycerophosphat-Puffer-Substrat

pH 7,5 = G 7,5

$$\text{Alkal. Phosphatase} = \frac{(\text{Ablesung G 9,3} - \text{Ablesung}_{\text{Kontrolle}})}{\text{Standardwert}} \cdot 6$$

$$\text{5-Nukleotidase} = \frac{(\text{Ablesung A} - \text{Ablesung}_{\text{Kontrolle}}) - (\text{Ablesung G 7,5} - \text{Ablesung}_{\text{Kontrolle}})}{\text{Standardwert}} \cdot 6$$

Die Aktivität der alkal. Phosphatase wird in BODANSKY-Einheiten ausgedrückt.

Definition der BODANSKY-Einheit (BE):

Eine Einheit nach BODANSKY ist in der Enzymmenge enthalten, die bei pH 8,75 bzw. pH 5,0 und 37 Grad C aus einer 0,5 %igen Natrium-β-glycerophosphat-Lösung in 1 Stunde eine 1 mg P entsprechende Menge Phosphat abspaltet.

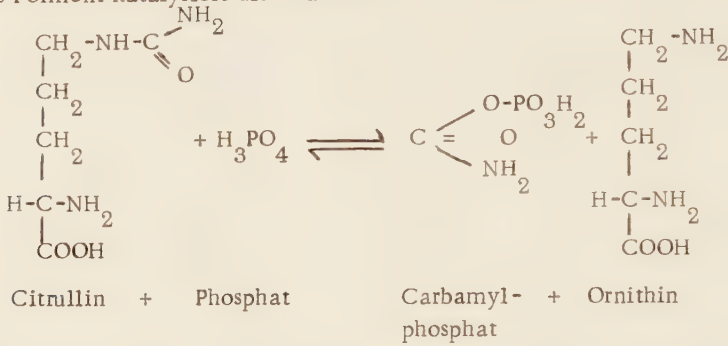
Gesunde zeigen eine Nukleotidase-Aktivität von 0 - 1,6 BE (1).

Literatur

- 1) Dixon, Th. und Purdom, M.: J. Clin. Path. 7 (1954) 341
- 2) Reis, J.: Biochem. J. 48 (1951) 548
- 3) Literatur bei 4)
- 4) Remy, D. und Mende, H.J.: Ärztl. Forschg. 11 (1957) 389

ORNITHIN-CARBAMYL-TRANSFERASE

Das Ferment katalysiert die Reaktion:



Die Ornithin-Carbamyl-Transferase (OCT) ist normalerweise in der Leber und in geringen Mengen, jedoch nicht regelmäßig, im Serum vorhanden.

Es überführt Ornithin in Gegenwart von Carbamylphosphat in Citrullin durch Übertragung des Carbamylrestes auf die δ -Aminogruppe des Ornithins, wobei ein Molekül Phosphat frei wird.

Das pH-Optimum des Fermentes liegt bei 7,1.

Das Enzym ist recht stabil. Man kann Serum 7 Tage lang im Eisschrank aufbewahren, ohne daß ein Aktivitätsverlust eintritt (1).

Klinik

Die Fermentkonzentration im Serum ist sehr stark erhöht bei epidemischer Hepatitis, fieberhafter Cholelithiasis mit Ikterus, infektiöser Mononukleose und bei der disseminierten Form des Lupus erythematoses. Die Werte können bei diesen Krankheiten bis auf das Hundertfache der normalen Aktivität ansteigen (2).

Karzinome mit Lebermetastasen und Leberzirrhosen gehen ebenfalls mit erhöhten Fermentwerten einher (1).

Bei der Hepatitis ergab sich ein enger Zusammenhang zwischen Fermentmenge und klinischem Bild. Mit fortschreitender Besserung sank der Enzymspiegel langsam zur Norm ab (1).

Ein erhöhter OCT-Spiegel im Serum läßt also mit Sicherheit auf eine Leberschädigung schließen.

Bestimmung der ORNITHIN-CARBAMYL-TRANSFERASE im Serum

REICHARD, H.: Scand. J. Clin. a. Lab. Invest. 9 (1957) 311

Prinzip

Das Ferment katalysiert auch die Arsenolyse von Citrullin:



Diese Reaktion liegt der Bestimmungsmethode für das Enzym zugrunde, und zwar wird dabei die Menge des aus Citrullin gebildeten NH_3 gemessen.

Reagentien

1. Serum
2. d, l-Citrullin in einer Konzentration von 0,2 m
3. Natrium-Arsenat-Puffer, pH 7,1, in einer Konzentration von 0,5 m
4. HClO_4 , 4-n
5. 0,01 N HCl
6. Kalium-Borat-Puffer (12,3 g HBO_3 + 80 ml 4-n KOH + Aqua redest. ad 500 ml)
7. Nessler's Reagens.

Ausführung

Man inkubiert 1 ml Serum bei 37 Grad C 24 Stunden lang mit 1 ml einer Lösung, die d, l-Citrullin (0,2 m) und Natrium-Arsenat-Puffer (0,5 m) enthält. 0,2 ml HClO_4 wird zugegeben und der Niederschlag abzentrifugiert.

1 ml des Überstandes wird in die Außenkammer eines Conway Mikrodiffusions-Standard-Apparates aus Plexiglas gegeben (äußerer Durchmesser 65 mm). Die Innenkammer enthält 1,3 - 2 ml 0,01-n HCl. 3 ml des Kalium-Borat-Puffers werden in die Außenkammer gebracht.

Nach einer Inkubation von 2 1/2 Stunden Dauer bei 37 Grad C bestimmt man die Menge des NH_3 in der Innenkammer mit Nessler's Reagens. Als Blindwert dient Serum, das mit Natrium-Arsenat-Puffer ohne Citrullin inkubiert und in gleicher Weise behandelt wurde wie der Test.

Standardisierung

Man drückt die Werte für OCT im Serum in Gramm Stickstoff pro ml Serum aus.

Literatur

- 1) Abderhalden, R. Klinische Enzymologie, p. 127 ff., G. Thieme Verlag
1958
- 2) Reichard, H.: J. Clin. Lab. Invest. 9 (1957) 311

OXYTOCINASE

Das Ferment im Serum stammt aus der Placenta. Es baut Oxytocin ab und macht es dadurch unwirksam. Vermutlich ist das Enzym eine Aminopeptidase (2). Der Fermentspiegel des Serums übersteigt bei hochschwangeren Frauen die Werte bei Nicht-Schwangeren um das 100 bis 1000fache (2).

Klinik

Das Enzym kann vom 16. bis 20. Tag an post impregnationem mit Hilfe des Oxytocin-Abbauversuches qualitativ und quantitativ nachgewiesen werden. Im Verlaufe der Schwangerschaft nimmt die Oxytocinase-Konzentration stetig zu und verschwindet post partum in 10 - 14 Tagen wieder völlig aus dem Blut.

Gegenüber der Norm verminderte Oxytocinase-Werte weisen auf eine Gefährdung der Schwangerschaft, in extremen Fällen auf intrauterinen Fruchttod hin (3).

Die Bestimmung der Oxytocinase ist von Bedeutung für die Schwangerschaftsdiagnose sowie zur Bestimmung des Alters der Frucht (1).

Bestimmung der OXYTOCINASE im Serum

WERLE, E. und SEMM, K.: Klin. Wschr. 29 (1951) 544

Prinzip

Die nach Inkubation einer bekannten Menge Oxytocin mit Serum verbleibende Hormonmenge wird im biologischen Test am Rattenuterus ausgewertet.

Reagentien

1. Oxytocinlösung
2. Serum

Ausführung

Man gibt zu 2,9 ccm Serum, aus Cubitalvenenblut gewonnen, 0,1 ccm Oxytocinlösung (Firma Hormon-Chemie, München) und inkubiert 5 Std bei 37 Grad C. Zur Unterbrechung der Reaktion wird der Ansatz auf 0 Grad abgekühlt. Danach wird am Rattenuterus an Hand einer Standardlösung (0,3 IE

Oxytocin in 3 ccm Tyrodelösung 5 Std bei 37 Grad C belassen) die im Serum-ansatz noch vorhandene Oxytocinmenge gemessen. Die Kontraktionen der uteri werden mit einer Hebelübertragung von 1 : 8 aufgezeichnet. Jede Lösung wird an zwei uteri zugleich ausgetestet. Nur wenn beide das gleiche Meßresultat ergeben, wird es verwertet. Die Zeit, die zur Testung eines Ansatzes benötigt wird, schwankt zwischen 15 und 100 min. Etwas zeitraubend ist die Messung bei Verwendung des Serums sehr junger Schwangerschaften. Die Bestimmung einer Schwangerschaft jenseits Mens V ist, die Inkubationszeit eingerechnet, innerhalb von 15 min möglich. Die Seren sollten möglichst am Tag der sterilen Blutentnahme, spätestens aber 3 Tage danach, zur Untersuchung kommen.

Die Messungen können gestört sein, wenn das Blutserum Chinin oder Gynergen enthält.

Die Oxytocinase-Aktivität ist am Ende der Schwangerschaft rund 1000mal so hoch wie nach der 4. Woche.

Als Testobjekt für die Oxytocinmessungen dient der isolierte Rattenuterus nicht kastrierter Tiere, von dem das vaginale Drittel verwendet wird.

Die Methode gestattet es, das Alter einer Gravidität auf 1 Woche genau zu bestimmen.

Es wurde die Frage des Bestehens einer Schwangerschaft bei 500 Frauen auf Grund von Oxytocinase-Bestimmungen mit einer Genauigkeit von 98 % entschieden.

Literatur

- 1) Semm, K.: Klin. Wschr. (1955) 817
- 2) Tuppy, H. und Nesvadba, H.: Mh. Chem. 88 (1957) 977
- 3) Werle, E. und Semm, K.: Klin. Wschr. 29 (1951) 544

PEPSINOGEN

Das Enzym Pepsinogen stellt die inaktive Vorstufe des Pepsins dar und kommt im Blut vor (1). Es ist somit von Bedeutung für die Aufspaltung der Proteine im Rahmen des Verdauungsprozesses. Das im normalen Plasma enthaltene Pepsinogen stammt vermutlich aus dem Magen (3).

Das Molekulargewicht des Fermentes beträgt 42.000 (1). Injiziert man ACTH intravenös, so steigt der Pepsinogenspiegel im Magenvenenblut (5).

Das Plasma Gesunder enthält mindestens drei Systeme, die bei saurer Reaktion eine proteolytische Aktivität entfalten. Das eine System ist aktiv bei pH 3,5 bis 4 und unabhängig von der Anwesenheit des Magens und wird bei pH 1,5 inaktiviert. Ein zweites System, aktiv bei 1,5 bis 3, ist ebenfalls unabhängig von der Anwesenheit des Magens und wird durch Alkalinisieren nicht beeinflusst.

Der Hauptanteil der Plasma-Aktivität bei pH 1,5 ist durch ein System bedingt, das sich wie Pepsin verhält. Man führt seine Anwesenheit auf die autokatalytische Umwandlung von Pepsinogen zurück (6).

Klinik

Bei einer Reihe von Patienten mit Duodenalulcus oder Magenulcus fand man stark erhöhte Pepsinogenwerte im Plasma (4). Nach subtotaler Gastrektomie und Magen-Carcinom hingegen war der Fermentgehalt des Blutes vermindert. Bei einer großen Gruppe von Patienten mit Perniciöser Anämie war der Pepsinogenspiegel im Plasma ebenfalls niedrig. So sind verminderte Plasmawerte bei Magengeschwür stark verdächtig auf Krebs, wenn eine Perniciöse Anämie ausgeschlossen werden kann (4; 5).

Nach erfolgreicher Vagotomie kann man ein Absinken des Pepsinogens im Plasma erwarten (4; 5).

Bei Urämie nimmt der Fermentgehalt des Blutes infolge glomerulärer Retention zu (3).

Bestimmung des PEPSINOGENS im Serum

MIRSKY, I. A., FUTTERMAN, P., KAPLAN, S. und BROH-KAHN, R. J.:
J. Lab. Clin. Med. 40 (1952) 17

Prinzip

Da Pepsinogen sich im Plasma autokatalytisch in Pepsin umwandelt, bestimmt man das Pepsin im Serum bei stark saurer Reaktion nach einer Modifikation der Methode von ANSON (10). Man läßt Plasma auf eine Hämoglobinlösung einwirken und bestimmt die Menge des freigesetzten Tyrosins.

Reagentien

1. 2,5 %ige Hämoglobin-Substratmischung (10):

Die dialysierte Hämoglobinlösung wird mit Wasser auf eine Konzentration von 2,5 g Protein pro 100 ccm verdünnt und zentrifugiert. Der geringfügige Niederschlag wird verworfen. 1,0 mg Merthiolat (Lilly) pro 40 ccm wird zur Konservierung zugesetzt. Toluol darf nicht verwendet werden, noch sollte die Menge an Merthiolat gesteigert werden, da größere Mengen eine signifikante Farbe mit dem Phenolreagens ergeben.

Die 2,5 %ige Hämoglobinlösung wird bei 5 Grad C aufbewahrt.

2. 3 n HCl

3. 0,3 n Trichloressigsäure

4. Plasma, aus Oxalatblut gewonnen.

Darstellung des Hämoglobins (Hb) (10)

Gerührtes Ochsenblut wird 20 - 30 min zentrifugiert. Serum und weiße Blutkörperchen werden abgegossen. Dann wäscht man die Erythrozyten mit dem gleichen Volumen kalter 1 %iger NaCl-Lösung und gießt nach Zentrifugieren den Überstand wiederum ab. Die so behandelten Blutzellen werden entweder in gefrorenem Zustande aufbewahrt oder sofort dialysiert und dann eingefroren.

Die Darstellung der Hb-Lösung aus den gewaschenen Erythrozyten erfolgt durch Dialyse in einem Cellophanschlauch gegen fließendes Leitungswasser, wobei niedermolekulare, farbstoffgebende Verunreinigungen weitgehend entfernt werden. Der Schlauch wird vor Einfüllen der Blutkörperchen mit Wasser auf seine Dichtigkeit geprüft. Bei der Dialyse gibt man zur Durchmischung des Inhalts einige Glaskugeln zu, verschließt dann die offenen Schlauchenden durch Knoten und hängt das Ganze in einen großen Behälter, der laufend mit Wasser durchströmt wird. Ab und zu dreht man den Dialysierschlauch um, wobei der Inhalt durchgemischt wird. Nach 24 Stunden ist die Dialyse beendet. Die Hb-Lösung wird in gefrorenem Zustande aufbewahrt.

Die Proteinkonzentration der dialysierten Hb-Lösung erhält man durch Bestimmung des Trockengewichtes (12 Std bei 105 Grad C) einer eingewogenen Probe von 3-5 g. Es ist dann

$$C_{\text{Protein}} = \frac{\text{Protein-Trockengewicht}}{(\text{Feuchtgewicht-Trockengewicht}) + 0,73 \cdot \text{Trockengewicht}} \text{ g/ml}$$

Das dialysierte Hb kann auch als lyophilisiertes Trockenpulver bei Zimmertemperatur aufbewahrt werden. Die im Handel erhältlichen Hämoglobine ergeben von der oben beschriebenen Methode abweichende Resultate.

Statt Hb kann man auch Casein und Edestin oder Eialbumin verwenden.

Ausführung

2 ml Plasma werden mit 10 ml 2,5 %iger Hämoglobin-Substrat-Lösung versetzt. Man bringt die Mischung mit 3-n HCl auf das gewünschte pH, gibt sie quantitativ in einen Meßzylinder und füllt mit Aqua dest. auf 15 ml auf. 6 ml dieser Mischung werden 24 Std lang in einem Wasserbad bei 37 Grad C inkubiert. Dann unterbricht man die Reaktion durch Zugabe von Trichloressigsäure, filtriert die Mischung und bestimmt die Konzentration der säurelöslichen tyrosinähnlichen Substanzen im Filtrat spektrophotometrisch nach FOLIN und CIOCALTEAU (11).

Zur Bestimmung der ursprünglich in der Plasma-Hämoglobinmischung vorliegenden Farbstoffkonzentration wird das Filtrat aus einer zweiten 6 ml-Probe der Plasma-Substratmischung verwendet, der vor dem Inkubieren 10 ml Trichloressigsäure zugefügt werden. Aus der Differenz zwischen den beiden Werten ergibt sich die Menge an chromogener Substanz, die während der Inkubation des Plasma-Substratgemisches entstanden ist. Da säurelösliche chromogene Substanzen nach längerer Inkubation des Hb-Substrates auch auf nicht-enzymatischem Wege auftreten, setzt man eine Blindwertlösung aus Aqua dest. und Hb an, behandelt sie wie die Plasma-Hb-Mischung und inkubiert ebenfalls 24 Std lang.

Berechnung

Die Menge des durch das Plasma freigesetzten "Tyrosins" ergibt sich, indem man die Menge chromogener Substanzen, die während der Inkubation des Hämoglobins mit Wasser entstanden sind, von der Menge, die bei der Inkubation des Plasma-Substratgemisches auftritt, subtrahiert.

Man drückt alle Ergebnisse aus in mAEq. "Tyrosin", die durch die proteolyti-

sche Tätigkeit von 1 ml Plasma freigesetzt werden.

Literatur

- 1) Abderhalden, R.: Klinische Enzymologie p.282, G. Thieme Verlag (1958)
- 2) Brown, R.K.: klin. Wschr. (1958) 1
- 3) Corazza, L.J. und Myerson, R.M.: J. Amer. Med. Ass. 165 (1957) 247
- 4) Harper, H.A.: in Ann. Rev. Med. (1958) 461
- 5) Hoar jr., C.S. und Browning, J.R.: zitiert bei 2)
- 6) Mirsky, A.E. et al.: J. Lab. Clin. Med. 40 (1952) 17

Bestimmung

- 10) Anson, M.L.: J. Gen. Physiol. 22 (1938) 79
- 11) Folin, A. und Ciocalteau, V.: J. Biol. Chem. 73 (1927) 627

PEPTIDASEN

Diese Fermente zerlegen Peptide durch Hydrolyse der Säureamidbindung in die Aminosäuren. Unter bestimmten Bedingungen katalysieren dieselben Fermente wahrscheinlich auch die Synthese von Peptiden (1).

Aminopeptidasen spalten Peptide, die aus drei und mehr Aminosäuren bestehen. Sie sind auf das Vorhandensein einer freien Aminogruppe angewiesen. Hingegen benötigt die Carboxypeptidase, die man in kristallisierter Form gewonnen hat, eine freie Carboxylgruppe. Die zelluläre Aminopeptidase wird auch als Kathepsin III, die zelluläre Carboxypeptidase als Kathepsin IV bezeichnet (1).

Dipeptidasen spalten nur Dipeptide (1).

Die Enzyme vermögen nur Peptide zu hydrolysieren, an deren Aufbau 1-Aminosäuren beteiligt sind. Nur im Blutserum, in den Hoden und Nieren findet sich eine aktive Dipeptidase, die Glycyl-d-Leucin zu spalten imstande ist (1).

Das pH-Optimum der Peptidasen liegt im schwach alkalischen Bereich (7,4 - 7,6). Die Peptidasen gelten als Metallproteide, da sie zur Erreichung ihrer vollen Aktivität auf die Gegenwart von Metallionen angewiesen sind (Co, Mn, Zn) (1).

Die Peptidasen sind, wenn man von der Carboxypeptidase absieht, weit verbreitet. Sie kommen auch im Blutserum, reichlich in den Leukozyten und Lymphozyten und ebenfalls in den Erythrozyten vor, welche 30 - 40mal mehr Peptidasen enthalten als das Plasma (1).

In Stroma-Suspensionen aus Erythrozyten wurden drei verschiedene Enzyme identifiziert:

- | | |
|----------------|--|
| Proteinase I, | mit einem pH-Optimum von 7,4, wird von Ascorbinsäure, Sulfhydrylverbindungen, Eisen- und Zinkionen aktiviert. |
| Proteinase II, | ebenfalls mit pH-Optimum bei 7,4, ist empfindlich gegen reduzierende Substanzen und wird stark aktiviert von Eisen- und Zinkionen. |
| Proteinase III | hat ihr pH-Optimum bei 3,2 und wird weder durch reduzierende Substanzen noch durch Metallionen aktiviert. |

Proteinase I ist 100mal stärker aktiv, Proteinase II etwa 10mal aktiver als

Trypsin. Proteinase III ist etwas weniger als 15mal aktiver als Pepsin. Die physiologische Bedeutung dieser Enzymeigenschaften ist noch unklar (2).

Aufgabe der proteolytischen Fermente in den Leukozyten ist es, Bakterien nach der Phagozytose zu verdauen und Entzündungsprodukte, Fibrinnetze und nekrotisches Gewebe aufzulösen.

Außerdem wirken die proteolytischen Leukozytenfermente neben anderen Faktoren aktivierend auf das fibrinolytische System (3; 5; 8; 9).

Die Leukozyten-Tripeptidase wird durch Co aktiviert. Das Gleiche gilt für die Glycyl-Glycin-Dipeptidase, die vorwiegend in Lymphozyten, weniger hingegen in den segmentkernigen Granulozyten vorhanden ist (4).

Klinik

Eine Zunahme des Tri- und Dipeptidasegehaltes im Blutserum findet sich vor allem dann, wenn größere Gewebsmengen zur Einschmelzung gelangen. Die Fermente treten dann aus den erkrankten bzw. zerfallenen Zellen ins Blut über. Daneben dürfte der Organismus den Peptidasenspiegel des Blutes aber auch von sich aus erhöhen, wenn vermehrt Eiweiß abgebaut wird, wie z.B. bei der Einschmelzung von Lungengewebe bei der Tbc (1).

Der Gehalt des Serums an Peptidase ist erhöht bei Verbrennungen, Knochenbrüchen, Krebs und Leukämien, lobärer Pneumonie, Operationsschock, entzündlichen Prozessen, fieberhaften Erkrankungen, Leberschäden (1).

Der Peptidasetest ist bei infektiöser Hepatitis, Stauungsleber und Cholecystitiden mit Leberkomplikationen den übrigen Leberfunktionsproben durchaus gleichwertig (10). Nur bei der Leberzirrhose waren die Ergebnisse unzuverlässig (1).

Sehr hoch ist auch der Peptidasegehalt bei der infektiösen Mononukleose. Die gleichzeitig bestimmte Serum-Aldolase war im Vergleich dazu nur gering erhöht und fiel viel früher wieder zur Norm ab (1).

Bei Nierenkrankheiten kommt es ebenfalls zu einer Erhöhung der Peptidasen (7). So z.B. bei verschiedenen Anurien, bei der akuten und subakuten Glomerulonephritis mit und ohne Niereninsuffizienz, bei der interstitiellen Nephritis mit chronischer Insuffizienz der Nieren, bei Nierenaplasie, Nieren-Tbc, polysystischen Nieren, sowie bei der Nephroangiosklerose. Lipoidnephrose und Amyloidniere gehen dagegen mit normalen oder unwesentlich erhöhten Werten einher (1).

Die Leucin-Aminopeptidase im Serum ist gesteigert bei Schwangerschaft, im Wochenbett und postoperativ bei einer signifikanten Zahl von Patienten mit metastasierendem Krebs. Das pH-Optimum dieses Fermentes liegt bei 7, 2 (6).

Der Gehalt der Leukozyten an Di- und Aminopeptidasen ist bei akuter Leukämie und chronischer myeloischer Leukämie gegenüber der Norm deutlich erhöht. Die Leukozyten von Patienten mit Lymphogranulomatose und mit chronischer lymphatischer Leukämie weisen normale Peptidasewerte auf (1).

Bestimmung der PEPTIDASEN im Serum

SCHWARTZ, T.B. und ENGEL, F.L.: J. Biol. Chem. 184 (1950) 197
dieselben : J. Biol. Chem. 180 (1949) 1047

Prinzip

Leucylglycylglycin wird mit Serum inkubiert und das in Freiheit gesetzte Leucin colorimetrisch mit Ninhydrin bestimmt.

Ausführung

Für den Peptidasetest dürfen nur hämolysefreie Seren herangezogen werden. Die enzymatische Hydrolyse wird in 10 ml-Erlenmeyerkölbchen unter Schütteln in einem Warburg-Thermostaten bei 37 Grad C durchgeführt.

Die Ansätze enthalten 0, 02 M Veronalpuffer (pH 8, 0), 0, 05 mM Leucylglycylglycin, 0, 2 ml Serum und 0, 85 %ige Kochsalzlösung, mit der auf ein Endvolumen von 2, 0 ml ergänzt wird.

Um den Ausgangswert, d.h. die Hydrolyse zur Zeit 0 festzulegen, gibt man das Serum in die auf 4 Grad C gekühlte Versuchsmischung und entnimmt nach 1 min die erste Probe (0-Probe). Nun wird der Ansatz rasch in den Thermostaten gebracht und mit dem Schütteln begonnen. In bestimmten Zeitabständen entnimmt man sodann Proben von 0, 2 - 0, 5 ml aus der Hydrolysemischung und pipettiert sie sofort in Meßkölbchen, in die 1 %ige Pikrinsäure vorgelegt wurde. Hierdurch wird die Enzymreaktion augenblicklich unterbrochen. Nach Auffüllen der Meßkölbchen bis zur Marke mit 1 %iger Pikrinsäure soll eine Endkonzentration von ca. 1 μ M Substrat pro ml der Verdünnung resultieren (z.B. : Substratkonzentration im Ansatz: 25 μ M/ml, Abnahme von je 0, 2 ml-Proben, Enteiweissung und Verdünnung in 5 ml-Meßkölbchen).

Die enteweißten Proben werden zentrifugiert und die Filtrate der Ninhydrin-

Reaktion nach MOORE und STEIN (15) unterworfen:

Je 0,2 ml der klaren Filtrate führt man in Reagenzgläser über, gibt jeweils 1 ml Ninhydrin-Reagens zu und verschließt die Gläser sofort mit einem Stopfen. (Das Ninhydrin-Reagens ist außerordentlich empfindlich. Zu hohe Werte können schon durch Tabakrauch hervorgerufen werden.)

Nach kurzem Schütteln entfernt man die Stopfen, bringt die Gläser für 20 min in ein Dampfbad, kühlt mit Leitungswasser ab und verdünnt schließlich mit 10 ml Propanol-Wasser, hergestellt durch Mischung gleicher Volumina Wasser und n-Propanol (p. a.) (15). Die Ablesung der Farbdichte erfolgt in einem geeigneten Kolorimeter oder Spektralphotometer bei der Wellenlänge $\lambda = 570 \text{ m}\mu$. Alle Proben sollen möglichst als dreifach-Bestimmungen durchgeführt werden einschließlich der Leerwerte (Wasser anstelle der Hydrolysatproben). Als Standard läßt man ein (willkürlich gewähltes) 40 %iges Hydrolysegemisch - zusammengesetzt aus Leucylglycylglycin, Glycylglycin und l-Leucin - mitlaufen. Dieser Wert muß gegen eine Vergleichsprobe des unhydrolysierten Substrates abgelesen werden. Dagegen mißt man die Hydrolyseproben gegen den Wert der "0-min-Hydrolyse" (vgl. oben).

Berechnung

Der Hydrolysegrad in Prozenten ergibt sich durch Multiplikation der gemessenen optischen Dichte (Mittelwert aus 3 Messungen) mit der Konstante K, die durch den Quotienten:

$$\frac{\% \text{ Hydrolyse der Standardlösung}}{\text{optische Dichte der Standardlösung}}$$

gegeben ist. Die hydrolytische Aktivität des Serums wird ausgedrückt durch die Konstante K^0 , welche angibt, welcher Prozentsatz an Leucylglycylglycin in 1 min durch 0,1 ml Serum pro ml Versuchsansatz gespalten wird.

Reagentien

Die Reagentien werden im wesentlichen nach der Vorschrift von MOORE und STEIN (15) zubereitet.

1. Ninhydrin

Um einen niedrigen Leerwert bei der photometrischen Messung zu gewährleisten, wird das Ninhydrin (handelsmäßige Herstellung nach der Methode von TEETERS und SHRINER (16)) umkristallisiert.

Zu 250 ccm Wasser gibt man 100 g Ninhydrin. Die heiße Lösung wird mit etwa 5 g Tierkohle behandelt. Man bewahrt das Filtrat bei 4 Grad C über Nacht auf. Das Ninhydrin wird auf dem Filter vier oder fünf Mal mit 20 ccm-Portionen kalten Wassers gewaschen. Die luftgetrockneten Kristalle werden in dunkler Flasche aufbewahrt. Ausbeute: 85 - 90 %.

2. Ninhydrin-Lösung

Man löst 0,80 g des Reagens $\text{SnCl}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ in 500 ccm Citratpuffer pH 5 (0,2 m). Diese Lösung gibt man zu 20 g des umkristallisierten Ninhydrins, das in 500 ccm Methyl-Cellosolve (Methylglykol) gelöst wurde. Man bringt die Reagenslösung in eine Vorratsflasche. Wenn das System nicht schon mit Stickstoff gefüllt ist, läßt man einen Stickstoffstrom 30 min lang durch den Tropftrichter hindurchgehen. Wird die Lösung in dieser Weise aufbewahrt, so ist sie mindestens einen Monat haltbar.

(Die Brauchbarkeit der Lösung kann geprüft werden, indem man die Farbentwicklung mit einer Standard-Aminosäurelösung von geringer Konzentration (1 mM) beobachtet.)

Das Ninhydrin-Reagens wird unmittelbar vor Gebrauch frisch hergestellt, da es exakte Ergebnisse nur innerhalb der ersten 24 Std nach Zubereitung ergibt.

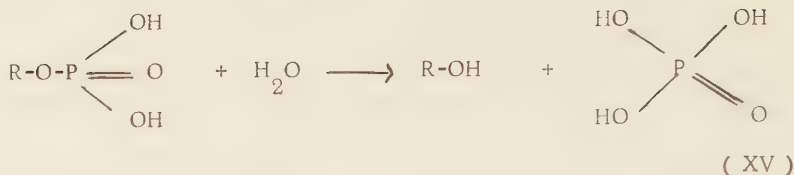
Literatur

- 1) Abderhalden, R.: Klinische Enzymologie p.139 ff., G. Thieme Verlag (1958)
- 2) Behrendt, H.: Chemistry of Erythrocytes, C. C. Thomas, Publ. Springfield, Ill. (1958) p. 205 ff.
- 3) Eichenberger, E.: (1955) zitiert bei 4)
- 4) Fleischer, G. A.: Ann. N. Y. Acad. Sci. 59 (1955) 665
- 5) Fritze, E.: Dtsch. Med. Wschr. 15 (1956) 602
- 6) Goldberg, J. A. und Rutenburg, A. M.: Cancer 11 (1958) 283
- 7) Richet, G.: zitiert bei 1)
- 8) Ungar, G. (1953): zitiert bei 4)
- 9) Ungar, G. et al. (1953): zitiert bei 4)
- 10) Weisbach, H. G.: zitiert bei Abderhalden (1) p. 142

Bestimmung

- 15) Moore, S. und Stein, W. H.: J. Biol. Chem. 176 (1948) 367
- 16) Teeters, W. O. und Shriner, R. L.: J. Am. Chem. Soc. 55 (1933) 3026

PHOSPHATASEN



Unter der Bezeichnung "Phosphatasen" versteht man eine große Zahl von Enzymen mit der gemeinsamen Eigenschaft, Bindungen, an denen Phosphorsäure beteiligt ist, zu spalten (5). Man teilt die Phosphatasen nach ihrer Substratspezifität ein in Phosphomonoesterasen, Phosphodiesterasen, Pyrophosphatasen, Metaphosphatasen und Phosphoamidasen (15).

Im gewöhnlichen Sprachgebrauch bezeichnet man jedoch mit "Phosphatasen" die Phosphomonoesterasen.

Es gibt mindestens vier Arten von Phosphomonoesterasen im Gewebe. Sie entsprechen dem Prinzip der "isodynamischen Wirkungsweise", d.h. sie zeigen dieselbe Substratspezifität, unterscheiden sich aber in ihrem pH-Optimum und in ihrem Verhalten gegenüber spezifischen Aktivatoren und Inhibitoren (5). Die am weitesten im menschlichen Gewebe verbreitete Phosphomonoesterase hat ein pH-Optimum bei pH 9,0 (alkalische Phosphatase). Andere isodynamische Enzyme haben ihr pH-Optimum bei saurer Reaktion (pH 3,8 und 6,0) (5). Die Bezeichnung "saure Phosphatase", ohne weitere Unterscheidung, bezieht sich immer auf den Typ, der bei pH 4,8 bis 5,2 am stärksten aktiv ist (5).

Von den verschiedenen Phosphatase-Typen sind bisher nur die alkalische und die saure Phosphatase von praktischer Bedeutung für die Klinik (1).

Die Phosphatasen spielen eine Rolle beim Stoffwechsel der Kohlenhydrate, Fette, Nukleoproteide und anderen Eiweißverbindungen, sowie beim Kalzifizierungsprozeß, im Tubulussystem der Niere und in der Darmschleimhaut, wo das Vorkommen der Phosphatasen mit der Zuckerresorption verknüpft ist (44).

Im normalen Serum findet sich sowohl saure als auch alkalische Phosphatase (5).

Phosphatasen sind Metall-Komplexe. Sie benötigen Zink oder Magnesium zu ihrer Aktivierung (55).

Sowohl die alkalische als auch die saure Phosphatase werden mit dem Harn ausgeschieden, letztere in weit größerer Menge. Dieses unterschiedliche Verhalten beruht wahrscheinlich auf der verschiedenen Molekülgröße beider Phosphatase-typen (1).

ALKALISCHE PHOSPHATASE

Das Enzym findet sich überall im Organismus, außer in den Gefäßwänden und im hyalinen Knorpel (1) besonders reichlich in Knochen, Darm, Leber und Niere (33; 47). Als Bildungsstätte der alkalischen Phosphatase (Aph) gelten Knorpelgewebe (Osteoblasten und Osteoklasten (30)), die Leber und das RES (50), außerdem die Niere (8a). Die Ausscheidung der Aph geschieht durch die Leber (51; 61).

Bei der Papierelektrophorese des normalen Serums ist die Aph-Aktivität in den Banden des α_2 - und β -Globulins lokalisiert (21).

Zwischen der Aph und dem Serum-Calcium besteht ein Antagonismus: Das Ferment sinkt bei Hypercalcämie. Auf diese Weise können wiederholte Aph-Bestimmungen zur Kontrolle des Blut-Calcium-Spiegels nützlich sein (22). Auch das Serum-Albumin ist ein Antagonist der Aph (29).

Die Aph hat ihr pH-Optimum zwischen 8,4 und 10,0 (5; 19), nach ABDERHALDEN zwischen 9,2 und 9,6 (1).

Aktivierend wirken auf das Ferment zweiwertige Metallionen wie Mg, Mn, Co, Zn (42), außerdem Cortison, ACTH, Stressfaktoren jeder Art (29), Oestrogene (29), Gallensäuren (34) und fettfreie Ernährung (51). Andere Inhibitoren sind: Cystin, Cystein, Methionin und Glutathion (14; 30) sowie Sulfonamide (14), Urethane (14), Chinone (30), Antibiotika (51), Chlorpromazin (11). Anorganisches Phosphat, das von der Aph freigesetzt wird, hemmt das Enzym kompetitiv (30).

Die Aph im Serum unterliegt, wie auch die alkalischen Organ-Phosphatasen, inkretorischen Aktivierungs- und Hemmungsmechanismen (29). Nach Hypophysectomie, Kastration oder Gaben von Corticosteroiden ist die Aph im Serum vermindert (1).

Man kann die verschiedenen Aph nach ihrer unterschiedlichen Affinität zu Glycerophosphat hinsichtlich ihres Ursprungs unterscheiden (47). So ist es z.B. in vielen Fällen von Hyperphosphatasie möglich, die im Serum kreisenden Mengen der Aph als Leber-Phosphatase zu charakterisieren (48).

Der Aph-Gehalt des Blutserums wechselt im Laufe des Lebens stark. Frauen zeigen einen um 20 - 25 % niedrigeren Phosphatasespiegel als Männer (1).

Die Aph ist ein sehr guter Gradmesser für den Knochenstoffwechselumsatz (6). Eine Erhöhung der Aph zeigt im wesentlichen eine vermehrte osteoblastische Tätigkeit an (4) und ist bei Knochenneubildungsvorgängen gesteigert (5).

In den letzten Monaten der Schwangerschaft ist die APH im allgemeinen gesteigert und erreicht zur Zeit der Geburt die höchsten Werte (31). Bedeutung und Ursache dieser Erhöhung sind noch unklar. Man vermutet einen Zusammenhang mit dem Aufbau des foetalen Skeletts (39) oder mit einer Demineralisation im mütterlichen Organismus (7; 11). Daß der erhöhte APH-Spiegel nicht durch einen latenten Mangel an Vitamin D bedingt sein kann, wiesen JUNG und STARK nach (31). Kurz post partum fällt die APH zunächst stark ab, was man auf den Wegfall der phosphatasereichen Plazenta zurückführt (32). Mit Einsetzen der Laktation steigt der APH-Spiegel des Serums wieder leicht an.

Im Menstrualblut ist die APH stark erhöht. Die Zusammensetzung des Menstrualblutes zeigt auch hinsichtlich anderer Fermente eine auffallende Übereinstimmung mit den Werten, die man im Venenblut in der Schwangerschaft fand (9).

Klinik

Verschiedene Knochenkrankheiten gehen mit einer starken Steigerung des Fermentspiegels im Serum einher: Osteosarkom, osteoblastische Knochenmetastasen, Morbus Paget, Morbus Recklinghausen, Osteomalazie (13; 31; 51), Frakturen (1; 13), Sudeck-Syndrom (56) und kindliche Rachitis (31).

Bei Morbus Basedow und Erkrankungen, die zur Überfunktion des HVL-Wachstumshormons führen, war die APH ebenfalls gesteigert, desgleichen bei infektiöser Mononukleose (31) und z. T. bei Lymphogranulomatose (27).

Schwerste Dystrophien, Skorbut, Hypothyreoidismus und Osteogenesis imperfecta sind von einer verminderten APH-Aktivität begleitet (49).

Hypophosphatasie. Die zuerst von RATHBUN 1948 (43) beschriebene Phosphatasemangel-Rachitis geht mit extrem niedrigen Fermentwerten im Serum sowie Hypercalcämie und Nierenschädigung einher. Das schwere klinische Bild ist gekennzeichnet durch mangelndes Wachstum in den ersten Lebensmonaten, Erbrechen und Obstipation sowie ausgedehnte Verkalkungsstörungen besonders am Schädel, aber auch an allen anderen Knochen. Die geistige Entwicklung ist nicht beeinträchtigt (36; 54). Charakteristisch ist im Röntgenbild die Kombination multipler Frakturen mit einer grob gestörten Ossifikation des Schädels (36). Phosphatase-Inhibitoren wurden als Ursache ausgeschlossen (54).

Diese rezessiv erbliche kongenitale Stoffwechselkrankheit tritt meist bei Kindern in den ersten zwei Lebensjahren auf. Die Prognose ist infaust (49).

Für die Differentialdiagnose: Osteoporose - Osteomalazie ist die Aph-Bestimmung oft von entscheidender Bedeutung. Die Alters- oder Involutions-Osteoporose geht mit normalen Aph-Werten einher (1).

Da die Aph mit der Galle ausgeschieden wird, kommt es bei Verlegung der Gallenwege zu einem pathologischen Übertritt des Fermentes ins Blut (37). So sprechen stark erhöhte Aph-Werte im Serum mit großer Sicherheit für einen Verschlaußikterus, besonders wenn sie 13 BODANSKY-Einheiten oder 30 Einheiten nach KING und ARMSTRONG überschreiten (1; 37). Demgegenüber ist die Aktivität der Aph bei Parenchym-Ikterus und Lebermetastasen nur mäßig erhöht (12; 20; 28; 52).

Der Anstieg der Aph ist einer der empfindlichsten Indikatoren für Lebermetastasen (38).

Beim hämolytischen Ikterus bleibt der Aph-Spiegel im Bereich der Norm (1; 51).

Die Bestimmung der Aph ist für die Diagnose besonders wertvoll, wenn sie mit guten Trübungstests verbunden wird, z.B. dem Thymoltest (12).

Bei den verschiedensten Leberkrankheiten läßt sich mit der Papierelektrophorese eine sehr schnell wandernde, vor den Albuminen laufende Fraktion mit hoher Phosphatase-Aktivität nachweisen. Diese Fraktion enthält 15 - 20 % der gesamten Phosphatase-Aktivität (21).

Alkalische Phosphatase in Leukozyten

Im Gegensatz zu den Erythrozyten, in denen eine Aph nicht sicher nachgewiesen werden konnte (5), haben die Leukozyten einen hohen Gehalt an Phosphatasen (18; 55), jedoch nur in jugendlichen, stabkernigen und segmentkernigen Granulozyten. Die unreifen Vorstufen sind stets frei von Phosphatase (44; 62).

Die Leukozyten-Phosphatasen sind in erster Linie im Cytoplasma lokalisiert, nicht im Kern (17; 64).

Chronisch myeloische Leukämie geht mit gesteigerter Fermentaktivität im Serum und verminderten Phosphatase-Werten in den weißen Blutzellen einher (1; 39a; 44; 45; 58; 59).

Bei der akuten lymphatischen Leukämie ist der Fermentgehalt der Leukozyten normal (44), ebenso bei der Lymphogranulomatose, solange keine Knochenherde vorhanden sind (1).

Die chronische Lymphadenose ist von stark erniedrigten Werten für die SPh begleitet. Frische Fälle zeigten noch eine normale SPh-Aktivität, präfinale Stadien hingegen den niedrigsten Enzymgehalt. Die APh blieb hierbei nicht wesentlich außerhalb der Norm (44).

Deutlich erhöht ist der APh-Gehalt der weißen Blutzellen bei Infekten (55; 16), Schock und Stress (57; 59) sowie Polycythämia vera (39a; 55; 59) und pyämischen Krankheitsbildern.

Bei der Phosphatase-Bestimmung muß man berücksichtigen, unter welcher Behandlung der Patient steht. Cortison, Zytostatika, Folsäure-Antagonisten und Triäthylmelamin (64) sowie gereinigtes ACTH-Gel (58) erhöhen die Aktivität der Leukozyten-Phosphatase.

SAURE PHOSPHATASE

Das Ferment ist in vielen Organen enthalten, auch im Serum, in Erythrozyten und Leukozyten. Den höchsten Gehalt weist jedoch die Prostata des Erwachsenen auf (8a).

Es gibt verschiedene saure Phosphatasen, die sich u. a. in ihren biochemischen Eigenschaften und ihrer Herkunft nach unterscheiden (2; 5; 46). Die saure Phosphatase (SPh) im normalen Blut wird deutlich gehemmt durch Fluorid und Citrat (5) und erfährt im Gegensatz zur alkalischen Phosphatase des Serums keine Steigerung der Aktivität durch Mg-Ionen. Diese SPh spaltet α -Glycerophosphat in ebenso großer Menge wie β -Glycerophosphat. Die Spaltung von Phenylphosphat wird sehr leicht katalysiert. Diese Eigenschaften sind identisch mit denen der SPh in Leber, Milz, Nieren und Knochen, - Organen, die als Quelle dieser normalen SPh gelten (53). Das pH-Optimum dieser SPh liegt zwischen pH 3, 4 und 4, 2 (1).

Die SPh, welche im Plasma von Patienten mit metastasierendem Prostata-Carcinom erscheint, wird durch Fluorid, Alkohole und l-Tartrat gehemmt (2).

Die SPh im Serum ist nicht identisch mit der SPh der Erythrozyten. Das Enzym der roten Blutkörperchen zeigt im pH-Optimum eine größere Affinität zu α -Glycerophosphat und Phenylphosphat als zu β -Glycerophosphat. Die schwache Fluoridhemmung und die Inaktivierung durch Alkohol unterscheiden sie von der SPh des Serums. Außerdem wird die Erythrozyten-SPh vollständig inaktiviert durch Cu-Ionen und Formaldehyd (5) und kann so von der Prostata-SPh unterschieden werden. 0, 2 mM Cu-Ion hemmen das Enzym quantitativ. Das

pH-Optimum dieses Enzyms liegt zwischen 5, 2 und 6, 2 (1).

Die Angaben über die Normalwerte der Sph in Erythrozyten schwanken stark. Jedenfalls ist die Sph-Konzentration in den roten Blutkörperchen beträchtlich höher als im Plasma.

Nur dürftige Daten existieren über Veränderungen der Sph in Erythrozyten bei Krankheiten. Beim Kaninchen ist die Entwicklung einer Anämie durch Blutverlust und Phenylhydrazin von einem Anstieg der Sph in den Erythrozyten begleitet, und dieser Anstieg geht der Erhöhung der Retikulozyten parallel. Mit der Rückkehr der Zahl der Blutzellen zur Norm sinkt der Sph-Spiegel auch wieder auf die Norm zurück (5).

Das Blutserum weist normalerweise nur eine sehr geringe Aktivität an Sph auf. Die Serum-Sph stammt aus dem Epithel der Prostata (3), wahrscheinlich auch aus Leber, Milz und Nieren (1).

Injektion von Androgenen führt zu einer verstärkten Tätigkeit des fermentbildenden Gewebes, Oestrogenzufuhr hingegen bremsst sie. Da das Prostata-Carcinom einen Tumor des Epithelgewebes darstellt, enthalten die Tumorzellen auch in den Metastasen große Mengen von Prostata-Sph (3).

Klinik

Die Sph kann bei vielen Krankheiten erhöht sein, selbst bei Gesunden. Darum ist die klinische Bedeutung der Sph-Bestimmung im Serum umstritten (66). Allerdings werden bei den verschiedenen Krankheiten (Rachitis, Gallengangsstauungen (26), Morbus Niemann-Pick und Morbus Gaucher (55a) sowie Osteogenesis imperfecta (19) u. a.) nie so hohe Werte beobachtet wie beim Prostata-Carcinom (1).

Excessive Sph-Steigerungen im Serum findet man bei unbehandeltem Prostata-Carcinom mit osteoblastischen Knochenmetastasen (23; 24; 40; 63). Ist das Neoplasma hingegen nur auf die Prostata beschränkt, so sind die Fermentwerte normal. Der Sph-Test ist also nicht für die Frühdiagnose des Prostata-Krebses zu gebrauchen (40).

Wertvoll ist die Bestimmung der Sph jedoch für die Kontrolle der Hormontherapie (8; 46). Bei erfolgreicher Behandlung mit Östrogenen sinkt der Sph-Gehalt des Serums (23). Die Normalisierung der Phosphatasewerte steht meist in guter Übereinstimmung mit der klinischen Besserung (1).

Manche Autoren sprechen der Sph-Bestimmung auch für die Diagnose des Prostatakrebses eine Bedeutung zu. So gelang es, mit Hilfe der l-Tartrat-Hemmung

der aus der Prostata stammenden SPh einige unvermutete Prostata-Karzinome zu entdecken (8; 40). Die diagnostische Genauigkeit dieser Methode wird noch verbessert durch Gaben von Testosteronpropionat für kurze Testperioden (Provokationstest). 50 mg 3mal pro Woche können ein signifikantes Ansteigen der "prostatistischen" SPh, als Folge des Tumorwachstums, zur Folge haben (8). Bei Gesunden zeigt sich kein Anstieg.

Durch Hemmung der Erythrozyten-SPh mit Kupfer fand man, daß ein hoher Prozentsatz von Patienten mit metastasierendem Mamma-Carcinom oder Prostata-Carcinom signifikant erhöhte Werte für kupferresistente SPh zeigte (46). Auch beim Mamma-Carcinom besteht eine Korrelation zwischen Regression der Knochenmetastasen, Abnahme der Hypercalcämie und anderen Zeichen objektiver Besserung einerseits und dem Abfall der erhöhten SPh-Werte andererseits (46).

Erhöhung der Körpertemperatur ist von einem Absinken der SPh begleitet. Bei fiebernden Patienten ist die Bestimmung der SPh daher nur von bedingtem Wert (1).

Ein anderer Provokationstest besteht darin, bei auf Prostata-Carcinom verdächtigen Patienten die Körpertemperatur durch Unterkühlung zu senken. Ein Anstieg der SPh deutet auf Prostatakrebs; bei Patienten ohne Prostata-Carcinom hat die Unterkühlung keinen Einfluß auf den Phosphatasespiegel des Blutes (35).

Bestimmung der ALKALISCHEN und SAUREN PHOSPHATASE im Serum

Nach der Methode von KING und ARMSTRONG (79).

Prinzip

Serum wird bei 37 Grad C in alkalischem bzw. saurem Milieu mit Phenylphosphat zusammengebracht. Durch die im Serum enthaltene Phosphatase wird Phenol aus dem Phenylphosphat abgespalten. Durch Zugabe von Phenolreagens nach FOLIN-CIOCALTEAU entsteht im alkalischen Milieu eine intensiv blaue Farbe, deren Extinktion colorimetrisch bei der Wellenlänge 578 m μ gemessen wird.

Reagentien

1. Dinatriumphenylphosphat p. a. (M. 3108)
2. Natriumkarbonat, wasserfrei p. a. (M. 6392)
3. Natriumbikarbonat p. a. (M. 6329)
4. Citronensäure p. a. (M. 244)
5. Natronlauge, normal (M. 9137)
6. Formaldehydlösung p. a. (M. 4003)
7. Phenolreagens nach FOLIN-CIOCALTEAU (Bayer)
8. Chloroform p. a. (M. 2445)

Herstellung der Lösungen:

1. 1/100 m-Phenylphosphatlösung:
0,436 g Dinatriumphenylphosphat in Wasser lösen, auf 200 ml auffüllen und mit einigen Tropfen Chloroform kurz durchschütteln. Die Lösung ist im Eisschrank etwa 8 Tage haltbar.
2. Alkalischer Puffer (pH 9):
1,27 g Natriumkarbonat und 0,67 g Natriumbikarbonat in Wasser lösen und auf 200 ml auffüllen.
3. Saurer Puffer (pH 4,9):
8,4 g Citronensäure in Aqua dest. lösen, 75 ml n Natronlauge hinzugeben und mit Aqua dest. auf 200 ml auffüllen. Mit einigen Tropfen Chloroform versetzt und durchgeschüttelt ist die Lösung im Eisschrank einige Wochen haltbar.
4. Formaldehydlösung:
Die 35 %ige Formaldehydlösung zu gleichen Teilen mit Wasser verdünnen (u. U. mit Natronlauge neutralisieren).
5. Phenolreagens (Bayer):
Vor dem Gebrauch mit Wasser auf das dreifache Volumen auffüllen.
6. 10 %ige Natriumkarbonatlösung:
10 g Natriumkarbonat in Aqua dest. lösen und auf 100 ml auffüllen.

Ausführung. (Werte für saure Phosphatase in Klammern):

2 ml Phenylphosphatlösung und 2 ml Puffer (und 0,1 ml Formaldehyd) im Zentrifugenglas in etwa 3 min auf 37 Grad C vorwärmen, dann 0,2 ml Serum zufügen und 15 min (60 min) bei 37 Grad stehen lassen. Anschließend 1,8 (1,7) ml Phenolreagens zufügen, gut mischen und zentrifugieren. Vom klaren Überstand 2 ml mit 3 ml Natriumkarbonatlösung versetzen und zur Farbentwicklung nochmals 5 min in ein Wasserbad von 37 Grad stellen.

Zu jedem Serumansatz stellt man einen Blindwert her, der genau wie oben behandelt wird; jedoch setzt man im Anschluß an die Serumgabe sofort Phenolreagens zu.

Die Messung der Farbdichte erfolgt in Küvetten von 10 mm Schichtdicke bei 578 m μ . Man kann den Vollwert gegen den Blindwert ablesen oder aber, und das ist bei einer Serie praktischer, Voll- und Blindwerte gegen Wasser messen und die Differenz der Extinktionen bilden.

Berechnung

$$E_V - E_B \cdot 85 = \text{Phosphatase-Einheiten}$$

Die Zahl der erhaltenen Einheiten entspricht bei der alkalischen Phosphatase den von KING und ARMSTRONG (79) und bei der sauren Phosphatase von GUTMAN und GUTMAN (77) angegebenen Werten. Infolgedessen werden die alkalischen Phosphatase-Einheiten als KAE (King-Armstrong-Einheiten) und die sauren Phosphatase-Einheiten als Gutman-Einheiten (GE) bezeichnet.

Normal: Alkal. Phosphatase: 5 bis 10 KAE (3 KAE entspr. 1 BE, Bodansky-Einheit)

Saure Phosphatase: 1 bis 3 GE

Eine Phosphatase-Einheit ist nach der Methode von KING-ARMSTRONG bzw. GUTMAN als die Fermentmenge in 100 ml Serum definiert, die 1 mg Phenol in Freiheit setzt.

Eine Phosphatase-Einheit nach BODANSKY (BE) ist in der Enzymmenge enthalten, die bei pH 8,75 bzw. pH 5,0 und 37 Grad C aus einer 0,5 %igen Natrium- β -glycerophosphatlösung in 1 Std eine 1 mg P entsprechende Menge Phosphat abspaltet.

Angaben zur Herstellung einer Eichkurve finden sich in der Arbeit von KIRBERGER und MARTINI (80).

Tabelle zur Bestimmung der sauren und alkal. Serumphosphatase (6)

Wellenlänge 578 μ m

Schichtdicke 10 mm

$$E_V \cdot E_B \cdot 85 = \text{Phosphatase-Einheiten}$$

Extinktion	Saure Phosphatase GE Alkal. Phosphatase KAE	Extinktion	Alkal. Phosphatase KAE Saure Phosphatase GE
0,010	0,85	0,150	12,75
0,015	1,28	0,160	13,60
0,020	1,70 Normalwerte	0,170	14,45
0,025	2,13 für saure	0,180	15,30
0,030	2,55 Phosphatase	0,190	16,15
0,035	2,98	0,200	17,00
		0,220	18,70
0,040	3,40	0,240	20,40
0,045	3,83	0,260	22,10
0,050	4,25	0,280	23,80
0,055	4,68	0,300	25,50
		0,320	27,20
0,060	5,10	0,340	28,90
0,065	5,53	0,360	30,60
0,070	5,95	0,380	32,30
0,075	6,38	0,400	34,00
0,080	6,80	0,420	35,70
0,085	7,23 Normalwerte	0,440	37,40
0,090	7,65 für alkal.	0,460	39,10
0,095	8,08 Phosphatase	0,480	40,80
0,100	8,50	0,500	42,50
0,105	8,93	0,550	46,75
0,110	9,35	0,600	51,00
0,115	9,78	0,650	55,25
0,120	10,20	0,700	59,50
		0,750	63,75
0,125	10,63	0,800	68,00
0,130	11,05	0,850	72,25
0,135	11,48	0,900	76,50
0,140	11,90	0,950	80,75
0,145	12,33	1,000	85,00

Bestimmung der PHOSPHATASEN in Leukozyten

REMY, D. und MENDE, H. J.: Ärztl. Forschg. 11 (1957) I/389

Prinzip

vgl. Aktivitätsbestimmung der Serum-Phosphatasen (S. 150).

Gewinnung der Leukozyten

Man bedient sich hierbei einer Modifikation der Methode von SZILARD (82). Sie beruht auf dem Prinzip, durch Hämolyse den Erythrozytenanteil zu zerstören und die übrig bleibenden Leukozyten nach Zentrifugation zu gewinnen. Nach Untersuchungen von HIRSCH (78) zeigen die so gewonnenen Zellen keine Atmung und Glykolyse mehr, so daß sie für andere Versuche nicht geeignet sind. Da mit defibriniertem Blut gearbeitet wird, besitzt die Methode den Vorteil, daß die Thrombozyten vollständig eliminiert sind.

Im einzelnen geht man folgendermaßen vor:

1. Mindestens 20 ml Venenblut werden in einem Glaskolben durch leichtes Schütteln mit Glasperlen defibriniert. Die weitere Aufarbeitung muß dann innerhalb von zwei Stunden erfolgen.
2. 10 ml defibriniertes Blut werden mit 0,5 ml EDTA (= Sequestren- Na_2 = Dinatriumsalz der Äthylendiamintetraessigsäure) versetzt, dazu gibt man in einem Becherglas 12 ml einer 2,5 %igen Essigsäurelösung und 3 ml einer 2 %igen Weinsäurelösung. Sodann wird Aq. dest. hinzugefügt, bis vollständige Hämolyse aufgetreten ist (Lackfarbe).
3. Dann wird schnell mit etwa 20 ml einer 2 %igen Kalilaugenlösung neutralisiert, bis die Flüssigkeit etwa scharlachrot geworden ist.
4. Diese Suspension wird in einem Spitzröhrchen 3 bis 4 min bei 1000 Umdrehungen / min zentrifugiert.
5. Nach Absaugen der überstehenden Flüssigkeit wird der Bodensatz mit einigen ml einer 0,5 %igen Essigsäurelösung versetzt. Anschließend wird erneut zentrifugiert und dreimal mit Locke-Lösung gewaschen.

Zusammensetzung der Locke-Lösung: (83)

H_2O : 1000 g;	NaCl : 9 g;
KCl : 0,2 - 0,25 g;	CaCl_2 : 0,2 - 0,25 g;

NaHCO_3 : 0,2 g; evtl. Glucose: 1,0 g.

6. Der Leukozytengehalt der Suspension wird nach üblicher Methode in der Thomakammer gezählt. Durch den Zusatz von EDTA werden die Zählungen ohne Schwierigkeiten möglich, während man sonst häufig Verklumpungen der weißen Blutzellen nach der Zentrifugierung beobachtete.

Bei orientierender Kontrolle ergab sich, daß auch die prozentuale Leukozytenverteilung in der Suspension dem vorher angefertigten Differentialblutbild entsprach, welches immer gleichzeitig aus dem Kapillarblut und nach Differenzierung von jeweils 100 Zellen bestimmt wurde.

Bestimmung der ALKALISCHEN PHOSPHATASE

nach KING und ARMSTRONG (79).

Hierbei ist ein Zusatz von Saponin zur Freisetzung der Phosphatase aus den Zellen erforderlich. Magnesium wird als Aktivator der Phosphatase zugesetzt (75).

Reagentien

1. 2 ml Dinatriumphosphat (1,3 g auf 600,0 ccm)
2. 1,5 ml alkalische Pufferlösung (zusammengesetzt: Na_2CO_3 : 1,27 g; NaHCO_3 : 0,67 g; H_2O ad 200,0 ccm).
3. 0,5 ml Saponinlösung (2 %ig in physiologischer Kochsalzlösung)
4. 0,2 ml Magnesiumchlorid (0,05 m)

Ausführung

1. Anwärmen des Ansatzes im Wasserbad von 37 Grad C für mehrere Minuten. Dann Zugabe von 0,3 ml Leukozytensuspension. Gut mischen und 15 Minuten im Wasserbad belassen.
2. Zugabe von 1,5 ml Phenolrotreagens nach FOLIN und CIOCALTEAU (76) in einer Verdünnung von 1 : 3 mit Aqua destillata.
3. Bei 2000 Umdrehungen / min 1 bis 2 Minuten zentrifugieren.
4. 4 ml der überstehenden Flüssigkeit mit 1 ml 25 %iger Natriumkarbonatlösung versetzen. Fünf Minuten Farbentwicklung im Wasserbad abwarten.
5. Photometrie (z.B. im Elektrophotometer "Eppendorf" der Firma Medeor) mit einer 0,5 cm Küvette bei einer Wellenlänge von 578 m μ gegen einen Blind-

wert, der ohne Inkubation bei Zusatz gleicher Reagentien gewonnen wird.

Berechnung

Die Berechnung für mg abgespaltenen Phosphor auf 10^{10} Granulozyten innerhalb 15 Minuten bei 37 Grad C erfolgt nach folgender Formel (XVI), die entsprechend den Molekulargewichtsverhältnissen von mg Phenol auf Phosphor bezogen wird:

$$\frac{22 \cdot a}{n \cdot g} \cdot 10^4 = \text{mg P} \quad (\text{XVI})$$

a = alkalische Phosphatase in KAE

n = Gesamtleukozytenzahl in $0,1 \text{ mm}^3$

g = Prozentsatz der Granulozyten

Bestimmung der SAUREN PHOSPHATASE

nach GUTMAN (77).

Die Methode wird in der gebräuchlichen Weise, allerdings ebenfalls mit Zusatz von Saponin und MgCl_2 durchgeführt.

Reagentien

1. 2 ml Dinatriumphenylphosphat (1,3 g auf 600,0 ccm)
2. 1,5 ml saure Pufferlösung (kristallisierte Citronensäure, gelöst in 75 ml 1 n NaOH und aufgefüllt auf 200 ml Aqua destillata)
3. 0,1 ml 20 % neutraler Formaldehyd.
4. 0,5 ml Saponinlösung (2 % in physiologischer Kochsalzlösung)
5. 0,2 ml Magnesiumchlorid (0,05 m)

Ausführung

1. Anwärmen des Ansatzes im Wasserbad bei 37 Grad C für mehrere Minuten. Dann Zugabe von 0,3 ml der Leukozytensuspension, gut mischen, 60 Minuten Verweildauer im Wasserbad.
2. Zugabe von 1,5 ml Phenolreagens nach FOLIN und CIOCALTEAU (76) in einer Verdünnung von 1 : 3 mit Aqua destillata.
3. Zentrifugieren bei 2000 Umdrehungen / min für 1 bis 2 Minuten.

4. 4 ml der überstehenden Flüssigkeit werden mit 1 ml 25 % Natriumkarbonatlösung versetzt. 15 Minuten Farbentwicklung im Wasserbad abwarten.
5. Photometrie (z.B. im Elektrophotometer "Eppendorf") in einer 0,5 cm-Küvette bei Wellenlänge 578 m μ gegen einen Blindwert ohne Wasserbadreaktion bei Zugabe gleicher Reagentien.

Die Berechnung in mg abgespaltenem Phosphor pro 10¹⁰ Leukozyten bzw. Lymphozyten erfolgt in analoger Weise wie oben für die Bestimmung der alkalischen Phosphatase angegeben.

Literatur

- 1) Abderhalden, R.: Klinische Enzymologie p.53 ff., G. Thieme Verlag 1958
- 2) Abul-Fadl, M.A.M. und King, E.J. (1949): zitiert bei 40)
- 3) Alyea, E.P. et al. (1956): zitiert in Dtsch. Med. Wschr. (1957) 52
- 4) Alyea, E.P. und Galleher, E.P. (1956): zitiert in Dtsch. Med. Wschr. (1957) 52
- 5) Behrendt, H.: Chemistry of Erythrocytes, p.207 ff., C.C. Thomas Publ., Springfield, Ill. 1958
- 6) Bodansky, A. und Jaffe, H.L. (1934): zitiert bei 31)
- 7) Bodansky, M. et al. (1939): zitiert bei 31)
- 8) Bonner, C.D. et al.: J. Am. Med. Ass. 164 (1957) 1070
- 8a) Brown, R.K.: Klin. Wschr. (1958) 1
- 9) Büssing, H.J.: Zbl. Gynäk. 79 (1957) 456
- 10) Cayla, J. und Fabre, F. (1935): zitiert bei 31)
- 11) da Cruz (1956): zitiert bei 29)
- 12) Cullinan, E.R.: Dtsch. Med. Wschr. (1957) 242
- 13) Dohrmann, R. und Thieme, H.J.: Arch. Klin. Chir. 283 (1956) 240
- 14) Dönnhardt, A. et al. (1953): zitiert bei 29)
- 15) Folley, S. und Kay, H.D. (1936): zitiert bei 5)
- 16) Follette, I.H. et al. (1952): zitiert bei 44)
- 17) Friederici, L. (1955): zitiert bei 44)
- 18) Fritze, E.: Dtsch. Med. Wschr. (1956) 602
- 19) Gebala, A.: Lancet (1956) 1084
- 20) Gibbons, T.B.: J. Am. Med. Assoc. 164 (1957) 22
- 21) Grassi, B. et al. (1958): zitiert von Weissbecker in Kongr. Zbl. ges. Inn. Med. 185 (1958) 154
- 22) Griboff, S.J. et al. (1954): zitiert in Ann. Rev. Med. (1956) 373

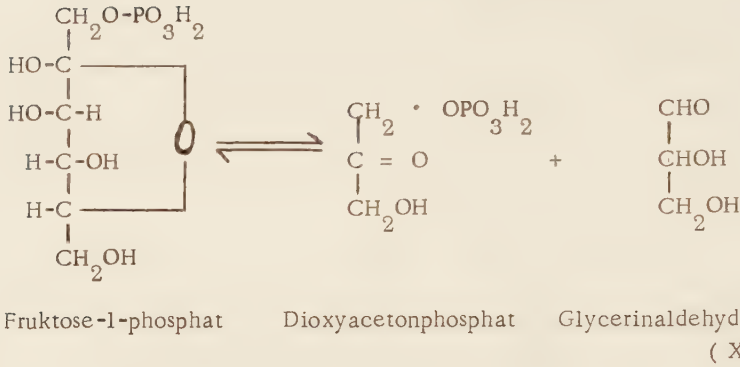
- 23) Grüning, W.: Klin. Wschr. (1950) 644
24) Gutman, A.B. und Gutman, E.B. (1938): zitiert bei 40)
25) Gutman, E.B. und Gutman, A.B. (1941): zitiert bei 5)
26) Hauss, W.H. und Leppelmann, H.J.: Klin. Wschr. 35 (1957) 65
27) Heilmeyer, L. et al.: Dtsch. Med. Wschr. 26 (1957) 1048
28) Hinsberg, K. und Bruns, F.: Dtsch. Med. Wschr. (1957) 48
29) Hippino, H. et al.: Klin. Wschr. (1958) 420
30) Hoffmann-Ostenhof, O.: Enzymologie p. 192 ff., Springer Verlag (Wien) 1954
31) Jung, W. und Stark, G.: Arch. Kinderheilk. 154 (1957) 23
32) Jung, W. und Stark, G.: Zentralbl. Gynäk. 78 (1956) 1201
33) Kay, H.D. (1932): zitiert in 5)
34) Kirberger, E. und Martini, G.A. (1950): zitiert bei 29)
35) London, M. et al.: zitiert in Abderhalden (1) p. 73
36) Macdonald, A.M. und Shanks, R.A.: Arch. Dis. Childhood 32 (1957) 304
37) Maier, C.: Schweiz. Med. Wschr. 4 (1955) 78
38) Mendelsohn, M.L. und Bodansky, O. (1952): zitiert in Ann. Rev. Med. (1956) 373
39) Meranze, Th. et al. (1937): zitiert bei 31)
39a) Miller, K.D. und Vunakis, H. van, (1956): zitiert bei 8a)
40) Nobles, E.R. et al.: J. Am. Med. Ass. 164 (1957) 2020
42) Portmann, P. (1957): zitiert bei 22)
43) Rathbun, J.C. (1948): zitiert bei 36)
44) Remy, D. und Mende, H.J.: Ärztl. Forschg. 11 (1957) 389
45) Remy, D. und Wieding, J.: Ärztl. Forschg. 11 (1957) 1/502
46) Reynolds, M.D. et al.: Cancer Research 16 (1956) 1/943
47) Roche, J. und Nguyen-van Thoai (1950): zitiert in 5)
48) Roche, J. und Sarles, H. (1949): zitiert bei 5)
49) Rominger, R.: Arch. Kinderheilk. 155 (1957) 105
50) Sauer, H. und Rausch-Stroomann, J.G. (1955): zitiert bei 29)
51) Simmer, H.: Dtsch. Med. Wschr. 81 (1956) 2108
52) Simons, R.C.: Am. J. Med. Sci. 228 (1954) 312
53) Sullivan, T.J. et al. (1942): zitiert bei 5)
54) de Toni, G. und Durand, P.: Minerva Pediatr. 8 (1956) 825
55) Trubowitz, S. et al.: Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med. 95 (1957) 35
55a) Tuchman, L.R. et al.: J. Mt. Sinai Hosp. 23 (1956) 227
56) Übermuth, H.: Arch. Klin. Chir. 284 (1956) 39
57) Vaccari, F. et al. (1955): zitiert bei 44)
58) Valentine, W.N. in Ann. Rev. Med. (1955) 77

- 59) Valentine, W.N. et al.: J. Lab. Clin. Med. 44 (1954) 219
- 60) Valentine, W.N. und Beck, W.S.: J. Lab. Clin. Med. 38 (1951) 39
- 61) Veen, H.H. et al. (1950): zitiert bei 29)
- 62) Wachstein, M. (1955): zitiert bei 45)
- 63) Walker, B.S. et al.: Am. J. Clin. Path. 24 (1954) 807
- 64) Wiltshaw, E. und Moloney, W.C.: zitiert bei 44)
- 65) Literatur bei 29)
- 66) Wojewski, A.: Urologia Polska 9 (1956) 35

Bestimmung

- 75) Cram, D. und Rossiter, R.J.: Canad. J. Res. 27 (1949) 290
- 76) Folin, A. und Ciocalteau, V.: J. Biol. Chem. 73 (1927) 627
- 77) Gutman, A.B. und Gutman, E.B.: J. Clin. Invest. 17 (1938) 473
- 78) Hirsch, R.: Pflügers Arch. 216 (1957) 506
- 79) King, E.J. und Armstrong, R.: Canad. Med. Assoc. 31 (1934) 376
- 80) Kirberger, E. und Martini, G.A.: Dtsch. Arch. klin. Med. (1950) 197
- 81) Remy, D. und Mende, H.J.: Ärztl. Forschg. 11 (1957) I/389
- 82) Szilard, P.: Pflügers Arch. 211 (1926) 597
- 83) Tschermak, A. v. et al.: in L. Ther.: Pharmakolog. Methoden,
Wissenschaftl. Verlagsges. Stuttg. (1949)

1-PHOSPHOFRUKT-ALDOLASE



Die 1-Phosphofruktaldolase (PFA) wurde in der Leber und Niere (3; 4) nachgewiesen. Im Blutserum kommt das Ferment normalerweise nicht vor. Obwohl sich das Enzym auch in der Niere findet, beeinträchtigt dies die Spezifität des Testes nicht, da die Unterscheidung zwischen Schädigung des Leberparenchyms und Niereninfarkt keine Schwierigkeit bietet. Bei Erkrankungen der Leber ohne Parenchymschädigung (Verschlußikterus, Lebermetastasen, Cholecystitis) tritt das Ferment nicht ins Blut über, bei geringen Parenchymschädigungen (wie etwa bei der Leberzirrhose) nur in relativ geringen Mengen.

Der PFA-Test ist dem Aldolase-Test an Spezifität überlegen. Im Gegensatz zum Aldolase-Test ist beim PFA-Test der Nachweis auch schon kleinster Mengen des Enzyms im Serum ein sicheres Zeichen für das Vorhandensein eines Leberparenchymschadens, vorausgesetzt, daß keine Nierenerkrankung vorliegt (1; 4).

Da bei abgeheilter Hepatitis der Aktivitätswert des Fermentes im Serum praktisch auf Null zurückgeht, kann man vor allem das Abklingen der Hepatitis genau verfolgen (4).

Die Menge des Fermentes im Serum gestattet also Rückschlüsse auf den Umfang der Schädigung und den Krankheitsverlauf (1).

Bestimmung der 1-PHOSPHOFRUKT-ALDOLASE im Serum

WOLF, H. P., FORSTER, G. und LEUTHARDT, F.:

Gastroenterologia 87 (1957) 172

Prinzip

Das bei der Aldolasespaltung auftretende Dioxyacetonphosphat wird in einer Hilfsreaktion mit Glycerophosphat-Dehydrogenase und DPNH zu α -Glycerophosphat umgesetzt, wobei die bekannte UV-Bande des DPNH verschwindet (vgl. auch Aldolasetest).

Reagentien

1. DPNH "Boehringer", di-Natriumsalz, purissimum.
100 mg werden in etwa 10 ml H_2O bidest. gelöst und unter Zusatz von Na-bicarbonat auf ein pH von 7,6 gebracht. Aufbewahrung in der Kälte.
2. Fruktose-1-phosphat-Bariumsalz "Boehringer".
1,8 g werden in 8 ccm Wasser gelöst, mit der gerade genügenden Menge gesättigter Na_2SO_4 -Lösung in das Na-Salz umgewandelt, der Niederschlag von $BaSO_4$ abzentrifugiert und die klare Lösung auf 10 ccm aufgefüllt. Die Stammlösung wird nach der Methode von ROE (2) auf ihren Fruktosegehalt geprüft. Aufbewahrung in der Kälte.
3. α -Glycerophosphatdehydrase "Boehringer", Kristallsuspension.

Ausführung des Testes

Mit 1,8 ml Serum in der Meßküvette wird die Extinktion auf den Wert 0 eingestellt. (Da Hepatitisserum oft stark gelb gefärbt ist, wird das Spektrophotometer "Eppendorf" auf "verstärkt" eingestellt. Der Spannungsteiler befindet sich dann meist auf Stufe 7.) Man gibt etwa 0,05 ml der DPNH-Lösung zu, so daß die Extinktion nach Vermischen auf etwa 1,2 steigt. Während 15 bis 20 Minuten wird im temperierbaren Troghalter bei 25 Grad C inkubiert. Nach dieser Zeit haben im Serum vorhandene reduzierbare Substrate reagiert. Dann fügt man etwa 40 μ α -Glycerophosphatdehydrase (Kristallsuspension) und 0,2 ccm Fruktose-1-phosphat-Lösung zu.

(Die Endkonzentration an Fruktose-1-phosphat sollte im Ansatz mindestens $2,2 \cdot 10^{-2}$ m betragen.) Man wartet weitere 5 Minuten, von diesem Zeitpunkt an ist die Reaktion im Falle einer Spaltung linear. Man stoppt nun die Zeit, die zur Änderung der Extinktion $\Delta E = 0,1$ nötig ist. Die Messung wird ebenfalls im temperierbaren Troghalter bei 25 Grad C ausgeführt.

Standardisierung

Normalserum benötigt zur Spaltung von Fruktose-1-phosphat unter den angegebenen Bedingungen mehr als 60 Minuten für eine Extinktionsänderung um

$\Delta E = 0,1$. Sie ist wahrscheinlich durch Reste von Pyruvat und anderen reduzierbaren Substanzen im Serum bedingt.

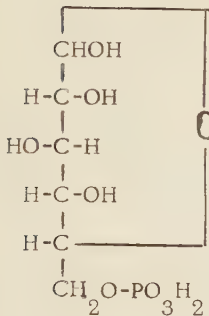
Bei akuten Leberzellschädigungen erhält man wesentlich kürzere Zeiten. Bei stark geschädigtem Parenchym fanden WOLF und Mitarbeiter sogar Werte von 3 Minuten.

Mit abnehmender Schädigung wird die Zeit länger, um den Normalwert von 60 Minuten und darüber zu erreichen, wenn Ausheilung eingetreten ist. Der Test stellt also ein quantitatives Maß für die Größe des Leberzellschadens dar.

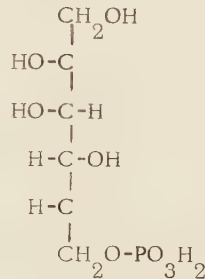
Literatur

- 1) Abderhalden, R.: Klinische Enzymologie, p. 120 ff., G. Thieme Verlag
1958
- 2) Roe, J.H.: J. Biol. Chem. 107 (1934) 15
- 3) Wolf, H.P. und Leuthardt, F.: Helv. chim. Acta (im Druck)
- 4) Wolf, H.P. et al.: Gastroenterologia 87 (1957) 172

PHOSPHOHEXO-ISOMERASE



Glukose-6-phosphorsäure
(Robison-Ester)



Fructose-6-phosphorsäure
(Neuberg-Ester) (XVIII)

Das Ferment katalysiert die reversible Umwandlung von Glukose-6-Phosphat in Fructose-6-Phosphat und spielt damit eine wichtige Rolle bei der Glykolyse.

Die Phosphohexo-Isoomerase (PHI) ist reichlich in Erythrozyten vorhanden (etwa 160mal stärker an Aktivität als im Serum) (3). Auch im Serum und in den Leukozyten kommt sie vor.

Das Serum des Neugeborenen zeigt eine höhere Aktivität als das mütterliche Serum (11). Im übrigen scheinen keine Alters- und Geschlechtsunterschiede zu bestehen (1). Das pH-Optimum des Enzyms liegt bei 6,95. PHI ist ziemlich stabil, so daß man Serum ohne Aktivitätsverlust im Eisschrank einige Tage, in gefrorenem Zustand sogar mehrere Wochen, aufbewahren kann (1).

6-Phosphoglukonsäure setzt schon in Konzentrationen von 0,001 Mol die Aktivität der PHI um 75 % herab. Auch Sorbit-6-phosphat ist ein stark wirksamer kompetitiver Hemmstoff. Glukose, Glukonsäure, Sorbit, Glukose-1-phosphat und anorganische Phosphate beeinflussen dagegen die Enzymaktivität nicht (1).

Klinik

Der Myokardinfarkt geht mit deutlich erhöhten PHI-Werten einher (8; 12). Der Höhepunkt der Fermentaktivität ist 24 Stunden nach Beginn der Schmerzen festzustellen (8). Danach sinken die Werte relativ schnell zur Norm ab (13).

Bei Leberkrankheiten findet man meist normale oder nur leicht erhöhte Aktivität der PHI. Nur bei der infektiösen Hepatitis zeigten sich stark erhöhte Werte,

in extremen Fällen bis zu 4660 E (6; 7; 8; 10).

Auch bei Diabetes mellitus war eine leicht gesteigerte Aktivität der PHI festzustellen (10).

Metastasierende Tumoren sind von erhöhten Fermentaktivitäten im Serum begleitet (4). Es besteht eine enge Korrelation zwischen dem Anstieg des PHI-Spiegels im Serum und dem Wachstum der Metastasen (3; 5), besonders beim Mamma- und beim Prostata-Carcinom (3; 5).

Die chronische myeloische Leukämie zeigt erhöhte Enzymwerte, und zwar geht die Isomerase-Aktivität dem Steigen und Fallen der Gesamtleukozytenzahl eng parallel. Doch kam es auch gelegentlich vor, daß die PHI-Werte eine Wendung zum Besseren oder einen Rückfall anzeigten, bevor die Zahl der weißen Blutzellen eine Änderung erkennen ließ. Die Aktivität der PHI spiegelt also weitgehend die Besserung oder Verschlechterung des klinischen Bildes wider (2).

Bei chronisch lymphatischer Leukämie bleiben die Isomerasewerte im Bereich der Norm. Vermutlich ist dies auf den niedrigen Fermentgehalt leukämischer Leukozyten zurückzuführen. Im isolierten Leukozyten betrug die Aktivität der PHI etwa das dreifache des Wertes bei den Lymphozyten (9). ISRAELS und Mitarbeiter nehmen daher an, daß die erhöhte Serum-Isomerase bei den Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie aus zerfallenden Leukozyten stammt.

Drei Patienten mit aleukämischer Leukämie zeigten normale oder nur leicht erhöhte Werte.

Bestimmung der PHOSPHOHEXO-Isomerase im Serum

BRUNS, F. und HINSBERG, K.: Biochem. Z. 325 (1954) 532

Prinzip

Die in der Zeiteinheit aus Glucose-6-phosphorsäure (G-6-P) gebildete Fructose-6-phosphorsäure (F-6-P) wird in den Trichloressigsäurefiltraten nach ROE (17) bestimmt.

Reagentien

1. Veronalpuffer, 0,1 m, pH 7,8
2. Glucose-6-phosphat, Natriumsalz, 0,06 m, pH 7,8
3. Trichloressigsäure, 7 %ig
4. Resorcin, 0,1 %ig in absolutem Äthanol
5. HCl, 30 %ig

Die G-6-P-Lösung wurde aus dem Bariumsalz ($C_6H_{11}O_9PBa \cdot 7 H_2O$, Schwarz-Laboratories, New York) mit Natriumsulfat hergestellt. Die Einstellung erfolgte durch Bestimmung des organischen P nach FISKE und SUBBAROW (15) und Bestimmung der Hydrolysegeschwindigkeit in $1 \cdot n H_2SO_4$. Daneben wurde G-6-P nach NELSON (16) bestimmt.

Ausführung

1,0 ml Serum wird mit 1,0 ml Veronalpuffer und 1,0 ml G-6-P-Lösung 30 oder 60 Minuten bei 37 Grad C inkubiert. Man enteiweißt mit 7,0 ml Trichloressigsäure und filtriert. Dem Leerwert wird die Substratlösung nach dem Enteiweißen zugesetzt. Zu 2,0 ml Filtrat (= 0,2 ml Serum) gibt man 2,0 ml Resorcinlösung und 6,0 ml HCl. Man erhitzt 8 min im Wasserbad bei 80 Grad C und kühlt anschließend 5 min in kaltem Wasser ab. Es entwickelt sich eine rote Farbe, deren Extinktion bei 490 m μ mit einem Coleman-Spektrophotometer gemessen wird.

Standardisierung

Als Maß der Enzymaktivität geben BRUNS und HINSBERG die Menge F-6-P in Kubikmillimetern an, welche unter den angegebenen Bedingungen durch 1,0 ml Serum bei 37 Grad C und pH 7,8 je Stunde aus G-6-P gebildet wird (1 Mikromol F-6-P = 260μ = $22,4 \text{ mm}^3$).

Eine Eichkurve wird mit eingestellter F-6-P-Lösung angelegt. Nach UMBREIT und Mitarbeitern (18) gibt F-6-P 61,5 % der Farbintensität der freien Fructose; BRUNS und HINSBERG fanden 55 % und legten diesen Wert ihrer Eichkurve zugrunde.

Normalwerte: Die Aktivität der PHI im Serum beträgt beim Gesunden im Durchschnitt 100 Einheiten (Schwankungsbreite 74 - 112) nach BRUNS und HINSBERG.

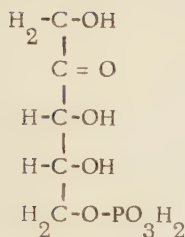
Literatur

- 1) Abderhalden, R.: Klinische Enzymologie p. 115 ff., G. Thieme Verlag 1958
- 2) Blanchaer, M.C. et al.: Blood 13 (1958) 245
- 3) Bodansky, O.: Cancer 8 (1955) 1087
- 4) Bodansky, O. et al. (1954): zitiert in Ann. Rev. Med. (1956) 170
- 5) Bodansky, O. (1954 b): zitiert bei 8)
- 6) Bruns, F. und Jacob, W.: Klin. Wschr. 32 (1954) 1041
- 7) Hinsberg, K. und Bruns, F.: Dtsch. Med. Wschr. (1957) 48
- 8) Israels, L.G. und Delory, G.E.: Brit. J. Cancer 10 (1956) 318
- 9) Israels, L.G. et al.: Blood 13 (1958) 79
- 10) Lickint, F.: Münch. Med. Wschr. 50 (1956) 1732
- 11) Marco, C. de, et al.: zitiert bei Antonini, E. et al.: Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. 32 (1956) 589
- 12) Siegel, A. und Bing, R.J.: Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 91 (1956) 604
- 13) White, L.P.: New Engl. J. Med. 255 (1956) 984

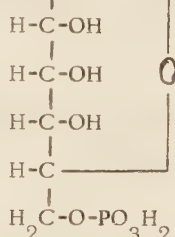
Bestimmung

- 15) Fiske, C.H. und Subarow, Y.: J. Biol. Chem. 66 (1925) 375
- 16) Nelson, N.: J. Biol. Chem. 153 (1944) 375
- 17) Roe, J.H.: J. Biol. Chem. 107 (1934) 15
- 18) Umbreit, W. et al.: Manometric techniques and related methods for the study of tissue metabolism. Minneapolis 1945

PHOSPHORIBO-ISOMERASE



Ribulose-5-phosphat



Ribose-5-phosphat (XIX)

Das Enzym katalysiert die reversible Umwandlung der Keto-Pentose in die Aldo-Pentose.

Die 5-Phosphoribo-Isomerase ist ein normaler Bestandteil des Serums. Rote Blutzellen besitzen eine hohe Isomerase-Aktivität (2). Sie ist etwa 1000mal höher als die des Serums. Wahrscheinlich entstammt die Isomerase des Serums zum größeren Teil den Erythrozyten (2).

Geschlechts- und Altersunterschiede wurden nicht beobachtet (1).

Die Phosphoribo-Isomerase, die zu den Sulfhydryl-Enzymen gehört, hat ein pH-Optimum von 7,5. Oxarsan bewirkt eine partielle, das Hg-haltige Diuretikum Salyrgan schon in Konzentrationen von nur $2 - 3 \times 10^{-5}$ Mol eine vollständige Inaktivierung. Sie kann durch Cystein weitgehend rückgängig gemacht werden (1).

Serum kann ohne Aktivitätsverlust etwa 3 Wochen in gefrorenem Zustand aufbewahrt werden. Das Enzym ist bemerkenswert hitzestabil. Hitzeinaktivierung wird erst bei Temperaturen über 60 Grad C deutlich. Selbst nach 1/2-stündigem Erhitzen auf 83 Grad C ist noch eine Restaktivität von rund 25 % meßbar (2).

Klinik

Bei verschiedenen Erkrankungen ergaben sich veränderte Werte im Serum. Erhöhte Aktivität fand man bei Lymphosarkom, Lymphogranulomatose, β -Plasmocytom, γ -Plasmocytom, Lebercarcinom, Carcinom des Collum, Rectums, der Mamma, des Magens oder der Blase, chronischer Nephritis, akuter und chronischer Hepatitis und Leberzirrhose (1).

Die Frage, ob dem Isomerasetest eine praktisch-klinische Bedeutung zukommt, ist vorerst wegen der geringen Zahl der untersuchten Fälle noch unentschieden (1).

Bestimmung der PHOSPHORIBO-ISOMERASE im Serum

BRUNS, F.H.: Biochem. Z. 327 (1956) 523

Prinzip

Das aus Ribose-5-phosphat (R-5-P) entstandene Ribulose-5-phosphat (Ru-5-P) wird mit Hilfe der Carbazolreaktion von DISCHE (6) photometrisch bestimmt.

Reagentien

1. Trispuffer (Trioxymethylaminomethan) (7) 0,1 m; pH 7,5
2. Ribose-5-phosphat, 0,03 m; pH 7,5
3. Trichloressigsäure, 10 %ig
4. H_2SO_4 (225 ml konz. Säure + 95 ml H_2O)
5. Cysteinhydrochlorid, 1,5 %ig
6. Carbazol, 0,12 %ig in Äthanol

Als Substrat verwendet man das Natriumsalz der R-5-P, welches sich aus dem Bariumsalz mit Natriumsulfat darstellen läßt. Der genaue R-5-P-Gehalt der Substratlösung wird mit der Methode von MEJBAUM (8) in der Modifikation von ALBAUM und UMBREIT (5) bestimmt. Es empfiehlt sich, die Lösung in gefrorenem Zustand aufzubewahren.

Ausführung

Man inkubiert 0,25 ml hämolysefreies Serum mit 0,25 ml Aq. dest., 0,5 ml Trispuffer und 0,5 ml Substratlösung 10 min bei 37 Grad C und stoppt die Reaktion mit 1,5 ml Trichloressigsäurelösung ab.

Die Leerprobe wird vor Zugabe der Substratlösung enteiweißt. Zu 1,0 ml des Trichloressigsäurefiltrates gibt man 6,0 ml H_2SO_4 , 0,2 ml Cystein- und 0,2 ml Carbazollösung. Die angegebene Reihenfolge ist einzuhalten, die Zugabe der Lösungen soll in 40 sec beendet sein. Es entwickelt sich eine rotviolette Farbe mit einem Absorptionsmaximum bei 540 $m\mu$, maximale Farbintensität wird nach 3stündigem Erwärmen im Wasserbad bei 37 Grad C erreicht. Nach Abkühlen auf Zimmertemperatur wird die Extinktion bei 540 $m\mu$ gegen

den Leerwert gemessen (Coleman-Spektrophotometer; Schichtdicke = 1 cm) und die entstandene Menge Ru-5-P an Hand einer Eichkurve ermittelt (Abb. 7).

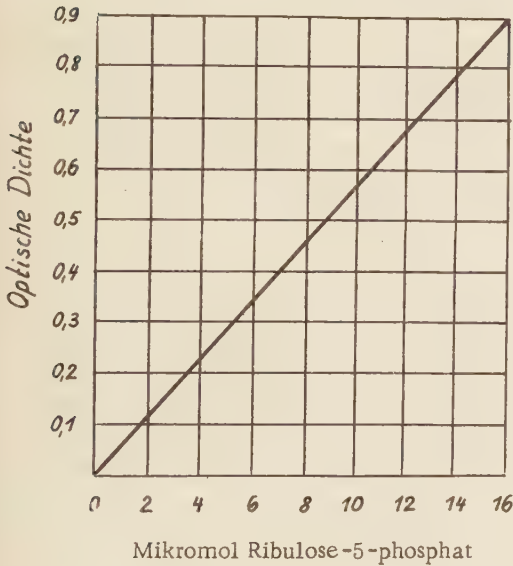


Abb. 7

Ordinate: opt. Dichte

Abszisse: Mikromol
Ru-5-P / ml Serum / Std /
37° / pH 7,5

Standardisierung

Man drückt die Phosphoribose-Isomerase-Aktivität aus durch die Menge Ru-5-P in Mikromol (1 Mikromol = 230 μ g Ru-5-P), die je Stunde durch 1,0 ml Serum bei pH 7,5 und 37 Grad C aus R-5-P gebildet wird. Die Eichkurve (Abb. 7) ist so angelegt, daß bei Einhaltung der beschriebenen Bedingungen die Aktivität je Milliliter Serum und Stunde direkt abgelesen werden kann.

Normale Mittelwerte liegen etwa bei 3,5 Mikromol Ru-5-P / ml Serum / Stunde.

Literatur

- 1) Abderhalden, R.: Klinische Enzymologie p.119 ff., G. Thieme Verlag
1958
- 2) Bruns, F.H.: Biochem. Z. 327 (1956) 523

Bestimmung

- 5) Albaum, H.G. und Umbreit, W.W.: J. Biol. Chem. 167 (1947) 369
- 6) Dische, Z. und Borenfreund, E.: J. Biol. Chem. 192 (1951) 583
- 7) Gomori, G.: Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 62 (1946) 33
- 8) Mejbaum, W.: Z. physiol. Chem. 258 (1939) 117

Bestimmung der SORBIT-DEHYDROGENASE im Serum

GERLACH, U.: Klin. Wschr. v 37 (1959) 93

Prinzip

Die Aktivität des Fermentes wird im optischen Test nach WARBURG mit Fructose als Substrat und DPN als Coferment auf Grund der Extinktionsänderung bei 366 m μ bestimmt (4).

Ausführung

Die Testkomponenten werden in folgender Reihenfolge einpipettiert:

0,2 M Triäthanolaminpuffer (pH 7,4) ad 3,0 ml;

0,1 ml DPNH₂ (10 mg/ml);

Blutserum.

Start mit 0,1 ml 40 % Fructoselösung.

Küvettschichtdicke 1 cm;

Meßtemperatur 24 Grad C.

Wellenlänge 366 m μ (Photometer Eppendorf).

Ablesung alle 60 sec über etwa 5 - 8 min nach erfolgtem Start (nachdem im vorangegangenen "Vorlauf" andere DPNH₂-abhängige Enzymsysteme abgelaufen sind).

Die Extinktionsabnahme pro Zeiteinheit ist der eingesetzten Enzymmenge proportional.

Standardisierung

Eine Aktivitätseinheit (E) besitzt diejenige Enzymmenge, die in einem Testansatz von 3 ml bei 1 cm Schichtdicke und 24 Grad C eine Extinktionsänderung von 0,001 pro min bei 366 m μ bewirkt (4).

Werte unter 1 E/ml Serum sind im optischen Test unter den angegebenen Bedingungen ungenau faßbar. Wurde im Serum keine SDH-Aktivität nachgewiesen, so ist deshalb der Ausdruck 1 E/ml statt 0 E/ml gebraucht.

Die Enzymaktivität der SDH wird in Aktivitäts-Einheiten (E) pro 1 ml Serum angegeben. Multiplikation der Serum-Aktivitätseinheiten mit dem Faktor 0,0545 gibt die Aktivität in μ Mol Substratumsatz pro 1 ml Serum pro Stunde an.

Literatur

- 1) Abderhalden, R.: Klinische Enzymologie p.121 ff., G. Thieme Verlag
(1958)
- 2) Blakley, R.L.: zitiert bei J.B. Wolff: Methods in Enzymology I, p. 348
- 3) Hoffmann-Ostenhof, O.: Enzymologie, Springer Verlag, Wien (1954) p.486
- 4) Holzer, H., Hahn, J. und Schneider, S.: Biochem. Z. 326 (1955) 451

THROMBOZYTEN-FERMENTE

Di- und Tripeptidasen, Alanylglycinase und Leucylglycylglycinase aus Thrombozyten wandern im Elektrophoresediagramm mit der gleichen Geschwindigkeit wie die entsprechenden Fermente anderer im Stoffwechsel sehr aktiver Gewebe (Milz, Lymphknoten, Leukozyten) (1).

Bei nicht-thrombopenischer Purpura und Menstruation fanden die Autoren eine weitgehende Hemmung der ATPase, Nukleotidasen und alkalischen Phosphatasen; Alanylglycinase war vermehrt aktiv (1).

Bei Leberinsuffizienz mit Hypoprothrombinämie (Laennec Cirrhose) und Hypoprothrombinämie durch Cumarinderivate waren ATPase, Nukleotidase, saure Phosphatase und alkalische Phosphatase in ihrer Aktivität vermindert (1).

Alanylglycinase hemmt in hoher Konzentration den Gerinnungsvorgang (2).

Bei Hemmung der ATPase können die Thrombozyten ihre energetische Funktion bei der Blutstillung nicht mehr ausüben (1).

PEDRAZZINI und SALVIDIO vermuten, daß die Thrombozytenfermente für die Blutstillung wichtig sind, einmal durch direkte lokale Einwirkung, und zum anderen durch Abgabe der notwendigen Energie für das Zustandekommen der Stoffwechselaktivität, die im Ablauf des Blutgerinnungsvorgangs unentbehrlich zu sein scheint (1).

Verhältnis der Fermentaktivität der Thrombozyten zu jener der Erythrozyten und peripheren Leukozyten (1)		
	Thrombozyten /Erythrozyten	Thrombozyten /Leukozyten
ATPase	116 : 1	3,6 : 1
Nukleotidase		1,44 : 1
Alkal. Phosphatase		0,81 : 1
Saure Phosphatase	55 : 1	1,56 : 1

Literatur

- 1) Pedrazzini, A. und Salvidio, E.: Schweiz. Med. Wschr. 38 (1956) 1097
- 2) Waldschmidt-Leitz, E.: Naturwissenschaften 10 (1928) 1027

rheumatikum Phenylbutazon hemmt die Transaminasen kompetitiv. Auch Sublimat ist ein Inhibitor (1).

Die Transaminasen sind ziemlich stabil. Im Kühlschrank können sie bis zu drei Wochen ohne Aktivitätsverlust aufgehoben werden. Nach vier Monate langem Stehen von Serum bei +4 Grad C zeigt sich eine Abnahme der Fermentwirksamkeit von ungefähr 40 % (1).

Das Serum des Gesunden enthält im Durchschnitt 22 (5-40) Einheiten an GOT und 16 (5-30) Einheiten an GPT pro ccm (Einheiten nach KARMEN) (1).

Die Transaminasekonzentration im Blut des Neugeborenen ist etwa doppelt so hoch wie die des mütterlichen Blutes (1).

Beide Enzyme werden z. T. in der Leber abgebaut (11) und mit der Galle ausgeschieden (4; 27). Daher hat man vermutet, die hohen Fermentwerte bei Hepatitis seien vielleicht durch verminderten Enzymabbau bedingt, nicht nur durch vermehrte Fermentfreisetzung (10).

Klinik

Die Erhöhung der Transaminasen im Serum ist ganz allgemein Ausdruck für eine Gewebsschädigung. Die von den meisten Autoren akzeptierte Theorie geht dahin, daß der allgemeine nekrotische Zusammenbruch der Zellen in dem betroffenen Organ die Transaminasen ins Blut freigibt (2; 14; 24).

Besondere Bedeutung hat die Bestimmung der Transaminasen im Serum (SGOT bzw. SGPT) bei der Diagnose des Myokardinfarktes.

Hier beobachtet man regelmäßig stark erhöhte Fermentwerte (6; 9; 18; 22; 25; 28). Die Steigerung der Enzymaktivität beginnt in den ersten 4 - 6 Stunden nach dem Infarkt ereignis und erreicht seinen Höhepunkt durchschnittlich am 2. - 3. Tage (2; 20; 28). Im Laufe etwa einer Woche sinken die Werte wieder auf die Norm ab (2; 6; 28). Der Grad der Transaminase-Erhöhung geht der Schwere des klinischen Bildes und der Größe des Infarktes parallel. Ausnahmsweise kann ein Infarkt einmal trotz ausgeprägter klinischer Symptome ohne gesteigerte Enzymaktivität ablaufen, wenn er ungewöhnlich groß ist. Man erklärt das damit, daß bei übermäßigem Infarkt der Kollateralkreislauf ausgeschaltet wird und folglich die Abbaustoffe gar nicht in die Peripherie gelangen können (28).

Der Transaminasetest ist von besonderem Wert bei Infarktpatienten, deren EKG infolge Schenkelblocks, früherer Infarkte oder Pericarditis verändert und

somit für die Infarktdiagnose nicht verwertbar ist, oder zur Früherkennung von Infarkten, wenn das EKG noch nichts zeigt (2; 11; 20). Bei solchen Patienten stimmte das klinische Bild in 84 % der Fälle mit dem Ergebnis des SGOT-Testes überein (20).

Die Transaminasewerte lagen bei den Infarktpatienten stets unter den beim gleichen Patienten bestimmten Werten der SMDH. Die Relationen der Fermentaktivitäten untereinander ($SMDH > SGOT \geq SGPT$) wie sie sich bei Gesunden zeigen, blieben auch bei den Infarktpatienten erhalten (2).

Beide Transaminasen verhalten sich weitgehend gleichsinnig (10): SMDH und SALD folgen meistens dem Verlauf der SGOT; jedoch in vielen Fällen im Vergleich zu den Transaminasewerten mit einer Verzögerung von 24 Stunden.

Eine Zunahme der Transaminase-Aktivität im Blut findet sich auch bei Myokarditis (1), Hirngefäßembolie (12) und Lungeninfarkt (3; 20) sowie häufig bei akuter Pankreatitis (3; 4; 20).

Angina pectoris und kompensierte Herzfehler sind hingegen von normalen Fermentwerten begleitet (12).

Die bei dekompensierten Herzfehlern beobachtete Zunahme des Fermentgehaltes dürfte auf der durch die Stauung bedingten Leberschädigung beruhen (4).

Bei der progressiven Muskeldystrophie (Erb) treten in der Mehrzahl der Fälle erhöhte Transaminasewerte auf. 90 % der jugendlichen Patienten unter 18 Jahren zeigten einen erhöhten Fermentgehalt im Blut (21).

Hohe Fermentwerte findet man auch bei der Dermatomyositis im akuten Stadium (26) und der Polymyositis (21). Auch Röntgenbestrahlung steigert die Enzymaktivität (15; 18).

Keine Änderungen im Fermentgehalt konnten festgestellt werden bei amyotrophischer Lateralsklerose, Myasthenia gravis, Wilson'scher Krankheit, Multipler Sklerose, Huntington'scher Chorea, Polyneuritis sowie Poliomyelitis (1).

Im Vergleich zu den Transaminasewerten bei Gesunden war bei Patienten mit Krebs und mit Leukämien keine Änderung der Fermentkonzentration in den Leukozyten und im Serum festzustellen (29).

Eine wertvolle Hilfe stellt der Transaminasetest auch bei der Diagnose und Differentialdiagnose der Leberkrankheiten dar. Erkrankungen der Leber sind meist von stark erhöhten Fermentwerten im Serum begleitet.

Wegen ihrer Empfindlichkeit eignet sich die Transaminase-Bestimmung besonders gut zur Frühdiagnose einer Leberzellschädigung. Schon 1 - 4 Wochen vor dem Auftreten eines Ikterus ist die SGOT deutlich erhöht (30). So kann man bei Hepatitis-Epidemien die Patienten mit Hilfe des SGOT-Testes schon im asymptomatischen oder prodromalen Stadium erkennen, behandeln und evtl. isolieren (30).

Hepatitis-Patienten zeigten meist SGPT-Werte, die über den SGOT-Werten lagen. Diese Konstellation gilt als charakteristisch für Hepatitis. Die Aktivität der Serum-Milchsäuredehydrogenase (SMDH) war in allen Fällen niedriger als die der Transaminasen (10).

Beide Transaminasen sind bei Leberkrankheiten etwa in gleichem Umfange vermehrt (1). Ein weiterer Unterschied gegenüber dem Verhalten der Transaminasen beim Herzinfarkt besteht im Verlauf der Aktivitätskurven. Beim Herzinfarkt ist der Anstieg steil, ebenso der Abfall zur Norm, der innerhalb weniger Tage eintritt. Bei Leberkrankheiten ist der Anstieg weniger steil und das Absinken auf den Normalwert erfolgt allmählich im Verlauf mehrerer Wochen oder Monate (1).

Es bestehen enge Beziehungen zwischen der Schwere des Krankheitsbildes und den subjektiven Beschwerden einerseits und der Höhe und Dauer des Fermentanstiegs andererseits (17; 23; 30). Bei vorzeitigem Aufstehen, Komplikationen und Rezidiven beobachtet man einen erneuten Anstieg der SGOT. Bei Übergang ins chronische Stadium der Hepatitis oder postinfektiöser Zirrhose bleibt die SGOT erhöht (30).

Die Virushepatitis geht mit stark erhöhten Transaminasewerten einher (4; 9; 14; 16; 17; 22; 31). Der Enzymgehalt kann bis auf das 500fache des Normalen gesteigert sein (32).

Bei der toxischen Hepatitis ist die Aktivität der Transaminasen weniger stark erhöht (28).

Infektiöse Mononukleose zeigt als Ausdruck einer begleitenden Leberschädigung einen Anstieg der Transaminasen, wobei SGOT stärker als SGPT erhöht ist. Die Transaminasen sinken im Laufe von etwa 2 - 3 Wochen langsam wieder zur Norm ab.

Gesteigerte Fermentaktivität im Blut findet man außerdem bei Gallenwegserkrankheiten (9; 14), CCl_4 -Vergiftung (34), biliärer Zirrhose (16; 33), Lebermetastasen (9a; 22; 33), chronischer Vergiftung mit Analgetica (30).

Leberzirrhose war nur bei einem Teil der Patienten von einer Hypertransaminasämie begleitet (9; 9a; 14; 16). Hierbei lag SGOT stets über den Werten der SGPT, also abweichend von der Konstellation der Hepatitis (10). Dekompensierte Patienten hatten einen höheren Transaminasegehalt als kompensierte. SGOT zeigte eine Tendenz, mit der Aktivität der Zirrhose zu wechseln (22).

Der Transaminasetest ermöglicht die Unterscheidung zwischen den verschiedenen Formen des Ikterus. Die bei der Hepatitis auftretenden extrem hohen Fermentwerte werden bei keiner anderen Leberaffektion beobachtet. Beim Verschlußikterus ist der Enzymgehalt im Serum höchstens mäßig vermehrt (2; 10; 30).

Mit Hilfe der Transaminase-Bestimmung kann man frühzeitig feststellen, ob ein Medikament leberschädigend wirkt. Von Wichtigkeit ist dies vor allem bei der Behandlung mit Tuberkulostatika (PAS, INH) und Narkotika (Megaphen) (10).

Zur Unterscheidung zwischen den verschiedenen Lebererkrankungen hat man auch den sog. Transaminase-Quotienten herangezogen.

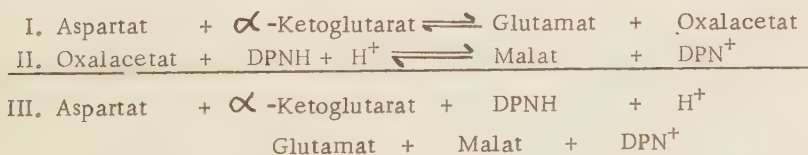
GOT / GPT-Werte über 1 sprechen für chronische Leberschäden, Werte unter 1 für akute Leberzellschädigung (19).

Bestimmung der GLUTAMINSÄURE-OXALESSIGSÄURE-TRANSAMINASE im Serum

STEINBERG, D. und OSTROW, B.H.: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. 89 (1955) 31

Prinzip

Die Transaminase-Aktivität wird mit Hilfe einer Modifikation der Methode von KARMEN und Mitarbeitern bestimmt. Hierbei wird die Transaminase-Reaktion (I) mit der Äpfelsäuredehydrogenase-Reaktion (II) gekoppelt:



Bei geeigneten Mengen von Substraten, Enzym und reduziertem Coenzym ist der Grad des Verschwindens von DPNH proportional der Transaminase-Konzentration.

Reagentien

1. Aspartat, 0,2 m
2. DPNH (1 mg/ml)
3. Phosphatpuffer, 0,1 m; pH 7,4
4. Äpfelsäuredehydrogenase-Präparat (15 μ g Protein) (= ÄDH)
5. α -Ketoglutarat, 0,1 m

Ausführung

0,5 ml Aspartat, 0,2 ml DPNH, 1,9 ml Phosphatpuffer und 5 Mikroliter ÄDH werden in einer Beckman-Küvette gemischt. Die Kontrollküvette enthält das Gleiche, abgesehen davon, daß DPNH durch Phosphatpuffer ersetzt wird.

Als Maß für die DPNH-Konzentration liest man die optische Dichte bei 340 m μ ab. (z.B. in einem Beckman DU Spektrophotometer.)

Bei der Gewinnung der Seren muß Hämolyse unbedingt vermieden werden, da sich sonst zu hohe Werte ergeben.

Nach Zugabe von 0,2 ml normalem oder pathologischem Serum kommt es zu einem anfangs schnellen, dann viel langsameren Verschwinden der DPNH, das in verschiedenen Seren bis zu 30 min andauern kann. Darum wartet man zweckmäßig 30 min, bis man die Aktivitätsbestimmung fortsetzt.

Nach 30 min also gibt man 0,2 ml α -Ketoglutarat hinzu. Darauf folgt ein rapider Abfall der Absorption bei 340 m μ , der den Beginn der Transaminase-Reaktion anzeigt.

Die Reaktion wird in Abständen von 1 bis 2 min nach Zugabe des α -Ketoglutarats verfolgt.

Standardisierung

Für die Berechnung legt man die im linearen Teil der Kurve liegende Reaktionsgeschwindigkeit zugrunde. Sinkt die optische Dichte unter 0,200, so weicht die Kurve oft von der Linearität ab.

Ein eventuell vorliegender "Leerwert", hervorgerufen durch das Hilfsenzym ÄDH, wird in Abrechnung gebracht.

Die Ergebnisse werden in Einheiten pro ml Serum angegeben. Eine Einheit ist definiert als die Transaminasemenge, welche unter den angegebenen Versuchsbedingungen eine Änderung der optischen Dichte bei 340 m μ um 0,001 pro min pro cm Schichtdicke zur Folge hat.

Die Aktivitätswerte bei gesunden Erwachsenen bewegen sich zwischen 10 - 33 Einheiten.

Berechnung nach HORN und AMELUNG (10)

Der Berechnung der Fermentaktivität wird der Extinktionskoeffizient von DPNH zugrunde gelegt. Er beträgt bei einer Wellenlänge von $\lambda = 366 \mu$ und einer Schichtdicke von 10 mm $3,4 \cdot 10^6 \text{ cm}^2 \cdot \text{Mol}^{-1}$. Danach entspricht einer Extinktionsabnahme von $\Delta E_{366} = 0,01$ ein Substratumsatz von 0,0029 μMol pro ml Testansatz. Die Größe des Substratumsatzes ist dabei das Maß für die Fermentaktivität, die in μMol Substratumsatz / ml Serum / Std angegeben wird. Daher muß im Reaktionsansatz die pro min gemessene Extinktionsdifferenz ΔE_{366} unter Berücksichtigung der im Testansatz vorhandenen Serummenge von 0,1 ml und des Testvolumens von 3 ml mit dem Faktor

$$F = 10 \cdot 60 \cdot 3 \cdot 0,0029 = 5,22$$

multipliziert werden. Die Aktivität der SGOT beträgt danach

$$\Delta E_{366} \cdot 5,22 \quad \text{Mol Substratumsatz / ml Serum / Std.}$$

Bestimmung der GLUTAMINSÄURE-BRENTZTRAUBENSÄURE-TRANSAMINASE im Serum

HORN, H.D. und AMELUNG, D.: Dtsch. Med. Wschr. 82 (1957) 619

Prinzip

Die Bestimmung der GPT im Serum (SGPT) geschieht analog der SGOT-Bestimmung dadurch, daß man die Transaminase-Reaktion mit einer DPNH-verbrauchenden Indikatorreaktion (hier dem von der MDH katalysierten Umsatz von Brenztraubensäure (BTS) zu Milchsäure) koppelt.



Reagentien

1. Alaninlösung, 0,05 m
2. DPNH
3. Milchsäure-Dehydrogenase (MDH)
4. Serum, verdünnt 1 : 5 mit Aqua bidest.

Ausführung

In eine 10 mm-Küvette werden eingebracht:

2,18 ml Alaninlösung,
0,1 ml DPNH,
0,02 ml MDH und
0,5 ml verdünntes Serum.

Der Reaktionsablauf wird analog dem Vorgehen bei der SGOT-Bestimmung nach einer Vorinkubationszeit von 30 min durch Zugabe von 0,2 ml der 0,1 m α -Ketoglutar säure-Lösung gestartet. Die Ablesung der Extinktion im Photometer erfolgt wie vorstehend beschrieben.

Berechnung

Entsprechend der SGOT-Bestimmung berechnet man die SGPT-Aktivität nach

$$\Delta E_{366} \cdot 5,22 \text{ } \mu\text{Mol Substratumsatz / ml Serum / Std.}$$

Literatur

- 1) Abderhalden, R.: Klinische Enzymologie p. 78 ff., G. Thieme Verlag (1958)
- 2) Amelung, D. und Horn, H.D.: Dtsch. Med. Wschr. (1956) 1701
- 3) Brown, R.K.: Klin. Wschr. (1958) 1
- 4) Chinsky, M. et al. (1956): zitiert bei 2)
- 5) Cohen, D. (1939): zitiert bei: Ber. ges. Physiol. 198 (1958) 127
- 6) Forster, G. und Weissmann, Ch.: Schweiz. Med. Wschr. 17 (1957) 519
- 7) Happold, F.C. und Turner, J.M.: Nature 179 (1957) 1025
- 8) Harper, H.A.: Ann. Rev. Med. (1958) 461 ff.
- 9) Hergt, K. und Langin, J.L.: Amer. J. Med. Sci. 233 (1957) 1017
- 9a) Hinsberg, K. und Bruns, F.: Dtsch. Med. Wschr. (1957) 48
- 10) Horn, H.D. und Amelung, D.: Dtsch. Med. Wschr. (1957) 619
- 11) Krause, S. und Krause, G. (1956): zitiert bei 2)

- 12) Liebermann, J. et al.: Ann. Int. Med. (1957) 46
- 14) Madsen, St. et al.: Brit. Med. J. (1958) 8
- 15) Milch, L.J. und Albaum, H.G.: Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 93 (1956) 595
- 16) Molander, D.W. et al.: J. Amer. Med. Ass. 163 (1957) 1461
- 17) Molander, D.W. et al. (1955): zitiert bei 10)
- 18) Nicola, P. de, und Candura: Medicina 3/4 (1957) 147
- 19) Literatur bei 10)
- 20) Ostrow, B.H. et al.: Circulation 14 (1956) 790
- 21) Pearson, C.M.: zitiert bei 1)
- 22) Reinhold, J.G.: Ann.Rev.Med. (1956) 170
- 23) Ritis, F. de, et al. (1955) und (1956): zitiert bei 10)
- 24) Rudolph, L.A. et al.: J.Lab.Clin. Med.49 (1957) 31
- 25) Siegel, A. und Bing, R.J.: Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 91 (1956) 604
- 26) Siekert, R.G. und Fleisher, G.A. (1956): zitiert bei 8)
- 27) Steinberg, D. und Ostrow, B.H.: Proc.Soc.Exper.Biol.Med. 89 (1955) 31
- 28) Wachtler, S.F. und Donato, R.A.: Dtsch.Arch.klin.Med. 204 (1957) 334
- 29) Waisman, H.A. et al.: Cancer Research 16 (1956) 344
- 30) Wroblewski, F. et al.: Annals Int. Med. 45 (1956) 782
- 31) Wroblewski, F. und La Due, J.S. (1955): zitiert bei 10)
- 32) Wroblewski, F. und La Due, J.S. (1955): zitiert bei 30)
- 33) Wroblewski, F. und La Due, J.S.: Cancer 8 (1955) 1155
- 34) Wroblewski, F. und La Due, J.S.: J. Lab.Clin. Med. 44 (1954) 958

TRYPSIN

Das Enzym gehört zu den proteolytischen Fermenten und ist vor allem im Pankreassaft enthalten. Seit WALDSCHMIDT-LEITZ (17) weiß man, daß "Trypsin" nicht ein einheitliches Enzym darstellt, sondern sich aus verschiedenen Fraktionen zusammensetzt: einer Proteinase, einer Carboxypeptidase und einer Protaminase (12). Möglicherweise lassen sich diese drei Fermente ebenfalls noch weiter differenzieren (12).

Die Pankreas-Proteinase wird von der Drüse in inaktiver Form als "Trypsinogen" abgegeben. Dieses Proferment kann dann durch Einwirkung der Enterokinase, durch autokatalytische Umwandlung oder durch Spaltung der Trypsin-Inhibitor-Verbindung in die aktive Form übergehen. Unter geeigneten Bedingungen zerfällt diese Verbindung in aktive Proteinase und den Inhibitor, ein niedermolekulares Polypeptid (13).

Die Proteinase ist als kristallisiertes Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 34 000 gewonnen worden (12). Auch das inaktive Trypsinogen konnte in kristallisierter Form isoliert werden. Die Struktur des Trypsins ist schon zum Teil bekannt (3).

Trypsin zeichnet sich vor anderen proteolytischen Fermenten des Serums dadurch aus, daß es im frischen Nativserum durch einen hemmenden Faktor blockiert ist. Man erklärt dieses Phänomen damit, daß das Enzym an sehr trypsinresistenten Serum-Eiweißkörpern in Form einer lockeren Adsorptionsbindung haftet, wodurch die wirksamen Gruppen des Fermentes blockiert werden. Einflüsse, welche die kolloidale Struktur dieser Eiweißkörper verändern (Alkohol, Aceton, Chloroform, Erhitzen, Erhöhen der pH-Konzentration) setzen das Trypsin mit seinen wirksamen Gruppen in Freiheit.

Bei Verschiebung des Milieus zum sauren pH hin (bei ca. pH 5,0 bis 6,5) hört die antitryptische Wirkung des Serums auf. In diesem Bereich ist die Trypsinase aber noch wirksam. Das ist für die Pathophysiologie der lokalen Entzündung von Bedeutung.

Über die Frage, ob die Hemmung des Trypsins durch menschliches Plasma reversibel sei, gehen die Ansichten auseinander. Man fand, daß es im menschlichen Plasma zwei trypsinhemmende Komponenten gibt, die der α_1 - und der α_2 -Globulinfraktion angehören (9). Diese beiden Inhibitoren reagieren reversibel mit Trypsin (9). Die Dissoziationskonstante für den Inhibitor im α_1 -Globulin beträgt $6 \cdot 10^{-10}$ und für den Inhibitor im α_2 -Globulin $3 \cdot 10^{-10}$ (9).

Harnstoff macht die sonst irreversible Hemmung von Trypsin durch Sojabohnen-Inhibitor reversibel (10; 11).

Calcium-Ionen bremsen die Wirkung des Trypsin-Inhibitors (1). Normalwerte für Serum-Trypsin-Inhibitor: 1, 032 Mikrogramm gebundenes Trypsin pro ml Serum $\pm$ 127 (1).

Dissoziationskonstante des Trypsin-Inhibitor-Komplexes:

$$8 \cdot 10^{-10} (1).$$

1 ml normales Serum hemmt 1, 03 $\pm$ 0, 13 mg Trypsin (1). Kristallisiertes Trypsin katalysiert die Hydrolyse innerer Peptidbindungen von Proteinen. Außerdem ist es ein starker Katalysator für die Hydrolyse gewisser Aminosäureester. Besonders spezifische Substrate dieser Art sind α -Benzoyl-L-arginin-methylester (BAME) und α -Toluen-sulfonyl-L-arginin-methylester (TSAME) (15).

Im Gegensatz zu Chymotrypsin wirkt Trypsin fördernd auf die Blutgerinnung (13). Große Trypsindosen zeigen in vitro und in vivo starke antikoagulierende Wirkung (8). Intravenös appliziertes Trypsin wirkt auflösend auf artifiziell gebildete intravasculäre Thromben bei Kaninchen und Hunden (8).

Klinik

Bei Pankreaserkrankungen steigt der Trypsingehalt des Serums, außerdem ändert sich die Gerinnungsfähigkeit des Blutes. Nach INNERFIELD (5) hängt der Plasma-Antithrombin-Titer direkt von dem Grad der Freisetzung von Trypsin in den Blutstrom ab. So kommt der Bestimmung des Plasma-Antithrombin-Titers (14) eine besondere Bedeutung bei der Diagnose von Pankreaserkrankungen zu (2; 6).

Experimentelle Trypsininjektion bei Hunden bewirkt ein der akuten Pankreatitis ähnliches Bild: eine Art Schock, Änderung der Blutgerinnung, Hyperamylasämie und Hypocalcämie.

Bei zwei Hämophilie-Patienten rief langsame Injektion von kristallisiertem Trypsin (gelöst in 200 - 300 ml physiologischer NaCl) eine signifikante Verkürzung der Gerinnungszeit hervor. Die Koagulationszeit kehrte nach etwa 1 Std auf den Ausgangswert zurück (16).

Gesunde und Patienten mit verschiedenen Erkrankungen (auch akutem Abdomen) zeigten vollständig negative Antithrombin-Titer. Akute Pankreatitis hingegen war in 91 % der Fälle von einem stark erhöhten Antithrombin-Titer begleitet.

Auch die Gerinnungszeit war bei diesen Personen wesentlich länger als bei den anderen Gruppen. Die Gerinnungszeit bei akuter Pankreatitis nahm bei einer Inkubationsdauer von 10 min um etwa 600 % zu (7).

In Fällen, in denen das Pankreas sekundär in Mitleidenschaft gezogen ist, wie bei perforiertem Magenulcus oder einer Gallenblasenaffektion, kann man ebenfalls erhöhte Antithrombin-Titer finden. Es ist für die Differentialdiagnose z.B. des akuten Abdomens von Bedeutung, daß in allen anderen Fällen der Antithrombin-Titer negativ ausfällt (7).

Ein Abfall des Antithrombin-Titers steht in sehr guter Korrelation mit der klinischen Besserung. Hingegen deuten Bestehenbleiben oder Ansteigen des täglich bestimmten Antithrombinspiegels auf eine Ausbreitung des akuten Entzündungsprozesses (7). Darum kommt der Bestimmung des Antithrombin-Titers auch prognostisch Bedeutung zu (7).

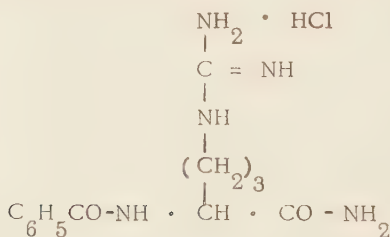
Bei der Bestimmung des Antithrombin-Titers hat man den technischen Vorteil, daß man das Oxalat- oder Citratblut 24-48 Std lang ohne Beeinträchtigung im Kühlschrank stehen lassen kann (7).

Bestimmung des TRYPSINS im Serum

NARDI, G.L.: J. Lab. Clin. Med. 52 (1958) 66

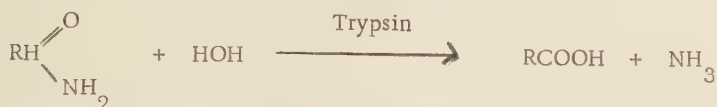
Prinzip

Es gibt synthetische Polypeptide, deren Amidbindungen nur für spezifische Enzyme angreifbar sind. Auf der Reaktion eines solchen spezifischen Substrates (α -benzoyl-1-arginin-amid-hydrochlorid) mit Trypsin beruht die folgende Bestimmungsmethode:



α -benzoyl-1-arginin-amid-hydrochlorid

Das Substrat hat obige Formel und ist im Handel erhältlich. Es wird von Trypsin sehr schnell hydrolytisch zerlegt. Dabei werden Benzoyl-1-arginin und Ammoniak in Freiheit gesetzt:



Das Ausmaß der Reaktion ist proportional der Fermentkonzentration.

Für die Durchführung der Bestimmung versetzt man das Patientenserum 1 Std lang mit dem Substrat. Das gebildete Ammoniak wird nach einer Modifikation (21) der Conway-Mikrodiffusionstechnik (20) titriert. Die Werte werden in Einheiten Trypsin-Aktivität ausgedrückt. Als Standard benutzt man lyophilisiertes Trypsin, das im Handel erhältlich ist. ("Tryptar", The Armour Laboratories, Kankakee, Ill.)

Reagentien

1. Phosphatpuffer, pH 7,8
2. Benzoyl-1-argininamid-hydrochlorid-monohydrat (BAA): 0,1 m in Phosphatpuffer 7,8
3. Borsäure, 2%ig
4. Indikator: 5 Teile einer 0,1 %igen alkoholischen Lösung von Bromkresolgrün, 1 Teil einer 0,1 %igen alkoholischen Lösung von Methylrot
5. K_2CO_3 , gesättigt
6. 0,01-n HCl
7. Vaseline zum Abdichten

Alle Reagentien werden mit frisch abgekochtem Aq. dest. hergestellt.

Ausführung

0,5 ml frischen Serums werden mit 0,5 ml Phosphatpuffer versetzt und das Ganze dann zu 1,0 ml BAA-Substrat gegeben. Diese Mischung wird bei Zimmertemperatur 1 Std lang mechanisch geschüttelt. Während des Schüttelns bringt man Vaseline auf die Glasdeckel. 1 ml der 2 %igen Borsäurelösung mit Indikator (olivgrüne Farbe) wird in die Zentralkammer einer Conway-Schale eingebracht.

Nach einstündigem Schütteln gibt man 0,2 ml der Probe in den äußeren Ring der Conway-Schale. 1 ml gesättigte K_2CO_3 -Lösung wird sofort in den äußeren Ring der Schale, der Probe gegenüber, pipettiert, wobei darauf zu achten ist,

daß beide sich nicht gegenseitig berühren. Die Schale wird fest mit dem Glasdeckel verschlossen. Dann werden K_2CO_3 und Probe miteinander vermisch, indem man die Schale 15mal rotieren läßt. Nach 1 Stunde wird die zentrale Kammer der Schale mit 0,01-n HCl bis zum Erscheinen der anfänglichen olivgrünen Farbe titriert und mit einer Schale verglichen, welche die ursprüngliche 2 %ige Borsäure und den Indikator enthält. Die folgenden Titrationen vergleicht man jeweils mit der unmittelbar vorhergehenden, nicht mit der ursprünglichen Schale.

Alle Bestimmungen werden doppelt ausgeführt, Leerwerte inbegriffen.

Berechnung

Die Menge der bei der Titration verbrauchten Säure wird gegen bekannte Konzentrationen von lyophilisiertem kristallinem Trypsin standardisiert. Die Ergebnisse werden in Einheiten Trypsinaktivität ausgedrückt.

Der "Standardfehler" der doppelt ausgeführten Bestimmung beträgt ± 50 Einheiten. NARDI setzte 100 Einheiten als obere Grenze des Normalbereichs fest.

Gesunde zeigen im Durchschnitt eine Trypsinaktivität von 31 E, Patienten mit Pankreatitis durchschnittlich 433 E. Sieben Kranke mit bioptisch verifiziertem Pankreaskarzinom wiesen eine mittlere Fermentaktivität von 394 E auf. Nach NARDI (22) ist die Bestimmung des Serum-Trypsins ein empfindlicheres und zuverlässigeres Hilfsmittel für die Diagnose von Pankreaserkrankungen als der Amylase- oder Lipasetest.

Literatur

- 1) Bundy, H.F. und Mehl, J.W.: J. Clin. Invest. 37 (1958) 947
- 2) Dreiling, D.A. et al. (1954): zitiert bei 4)
- 3) Gabeloteau, C. und Desnuelle, P.: Bull. Soc. Chim. biol. 40 (1958) 35
- 4) Harper, H.A.: in Ann. Rev. Med. (1958) 462 ff.
- 5) Innerfield, I.: J. Clin. Invest. (1952): zitiert bei 4)
- 6) Innerfield, I.: N. Y. State J. Med. (1952): zitiert bei 4)
- 7) Innerfield, I. et al.: Am. J. Med. 12 (1952) 24
- 8) Innerfield, I. et al.: J. Clin. Invest. 31 (1952) 1049
- 9) Jacobsson, K. (1953): zitiert bei 1)
- 10) Jacobsson, K.: Biochim. Biophys. Acta (1955): zitiert bei 1)
- 11) Jacobsson, K.: Scand. J. Clin. Lab. Invest. (1955): zitiert bei 1)

- 12) Lehnartz, E.: Einführung in die Chemische Physiologie, 10. Aufl.,
Springer Verlag (1952) p. 304 ff.
- 13) Northrop, H.: zitiert bei 12)
- 14) Bestimmung des Plasma-Antithrombin-Titers nach Quick:
Am. J. Physiol. 123 (1938) 712
- 15) Schwert, G.W. et al.: J. Biol. Chem. 172 (1948) 221
- 16) Tagnon, H.J.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 57 (1944) 45
- 17) Waldschmidt-Leitz, E.: zitiert bei 12)

Bestimmung

- 20) Conway, E.J.: Micro-Diffusion Analysis and Volumetric Error, London
(1939), Crosby, Lockwood and Son.
- 21) Mc Dermott, W.V. jr. und Adams, R.D.: J. Clin. Invest. 33 (1954) 1
- 22) Nardi, G.L. und Lees, C.W.: New Engl. J. Med. 258 (1958) 797

Zu großem Dank bin ich Herrn Professor
Dr. Otto Wieland für sein Verständnis
und die freundliche Beratung bei der Ab-
fassung der vorliegenden Arbeit verpflichtet.

Außerdem danke ich Fräulein Dipl. Chem.
Brigitte Liebold für ihre Anregungen und
Frau Helene Perović für die technische
Hilfe bei der schriftlichen Niederlegung.

Das Herausgeberkollegium der Münchner
Medizinischen Wochenschrift hat die
Drucklegung der Arbeit in großzügiger
Weise finanziell unterstützt, wofür auch
an dieser Stelle aufrichtig gedankt sei.

Lebenslauf

Am 14. August 1931 wurde ich als Tochter des Augenarztes Dr. med. Max Bücklers und seiner Ehefrau Doris, geb. Dilthey in Tübingen geboren.

Von 1938 bis 1942 besuchte ich die Volksschule in Tübingen und Hannover, von 1942 bis 1947 höhere Mädchenschulen in Hannover, Altkirchen (Westerwald) und Rheydt. Durch die Kriegsereignisse wurde der Schulbesuch ein Jahr lang unterbrochen. Von 1947 bis 1949 war ich Schülerin des Kaiser-Wilhelm-Gymnasiums in Hannover. 1949 zogen meine Eltern nach Mönchen-Gladbach. Dort trat ich in das Städtisch-Humanistische Gymnasium ein und bestand Ostern 1951 das Abitur.

Von 1951 bis 1952 besuchte ich die Landfrauenschule in Birkelbach (Westfalen), anschließend daran eine Handelsschule in Mönchen-Gladbach.

Im Wintersemester 1952/53 begann ich an der Universität Bonn mit dem Studium der Medizin, Psychologie und Pädagogik. In Tübingen setzte ich diese Studien bis zum Sommer 1954 fort und kehrte dann an die Universität Bonn zurück. Wegen Krankheit mußte ich das Studium bis Mai 1956 unterbrechen. Im Sommersemester 1956 nahm ich das Studium in Bonn wieder auf und legte im Herbst des gleichen Jahres dort die ärztliche Vorprüfung ab. Während der beiden ersten klinischen Semester studierte ich an der Universität Zürich, vom Wintersemester 1957 an in München. Hier verheiratete ich mich im Sommer 1959 mit Dr. jur. Herbert Wiedemann. Im Dezember 1959 schloß ich das Studium mit der ärztlichen Prüfung ab.

